



Titre: Production du virus influenza dans des cellules HEK-293 cultivées en suspension
Title:

Auteur: Audrey Anne Le Ru
Author:

Date: 2010

Type: Mémoire ou thèse / Dissertation or Thesis

Référence: Le Ru, A. A. (2010). Production du virus influenza dans des cellules HEK-293 cultivées en suspension [Mémoire de maîtrise, École Polytechnique de Montréal].
Citation: PolyPublie. <https://publications.polymtl.ca/303/>

 **Document en libre accès dans PolyPublie**
Open Access document in PolyPublie

URL de PolyPublie: <https://publications.polymtl.ca/303/>
PolyPublie URL:

Directeurs de recherche: Olivier Henry, & Amine Kamen
Advisors:

Programme: Génie chimique
Program:

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

**PRODUCTION DU VIRUS INFLUENZA DANS
DES CELLULES HEK-293 CULTIVÉES EN SUSPENSION**

AUDREY ANNE LE RU

DÉPARTEMENT DE GÉNIE CHIMIQUE
ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL

MÉMOIRE PRÉSENTÉ EN VUE DE L'OBTENTION
DU DIPLÔME DE MAÎTRISE ÈS SCIENCES APPLIQUÉES
(GÉNIE CHIMIQUE)

AVRIL 2010

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL

Ce mémoire intitulé:

**PRODUCTION DU VIRUS INFLUENZA DANS
DES CELLULES HEK-293 CULTIVÉES EN SUSPENSION**

présenté par : LE RU Audrey Anne

en vue de l'obtention du diplôme de : MAÎTRISE ÈS SCIENCES APPLIQUÉES

a été dûment accepté par le jury d'examen constitué de :

M. DE CRESCENZO Grégory, Ph.D., président

M. HENRY Olivier, Ph. D., membre et directeur de recherche

M. KAMEN Amine, Ph. D., membre et codirecteur de recherche

Mme von MESSLING Veronika, D.V.M., Ph.D., membre

DÉDICACE

"On ne va jamais aussi loin que quand on ne sait pas où l'on va."

Oliver Cromwell

REMERCIEMENTS

Je souhaite tout d'abord remercier mes deux directeurs de recherche, le Dr. Amine Kamen, chef du groupe "Technologie des cellules animales" du secteur Bioprocédés de l'IRB-CNRC et le Prof. Olivier Henry, professeur de l'Ecole Polytechnique, pour m'avoir offert l'opportunité de réaliser cette maîtrise. Je remercie sincèrement le Dr. Amine Kamen pour la qualité de son encadrement, sa grande disponibilité, ainsi que pour la confiance et l'autonomie qu'il m'a accordées tout au long de ma recherche. Je tiens aussi à remercier le Prof. Olivier Henry pour son écoute attentive et ses conseils avisés.

J'aimerais également remercier tout particulièrement Danielle Jacob et Julia Transfiguration pour leur expertise et leur implication respective au projet Influenza, sans oublier tous mes autres collègues du groupe de Technologies des cellules animales avec qui j'ai eu le plaisir de travailler durant ces deux années : Alice Bernier, Louis Bisson, Brian Cass, Parminder Chahal, Yves Durocher, Denis L'abbe, Stephane Lanthier, Jamal Meghrous, Yimi Mena, Johny Montes, Ricardo Ochoa, Sylvie Perret, Chun Fang Shen, Gilles St-Laurent, Roseanne Tom, Rosa Tran et Robert Voyer. Merci infiniment de m'avoir guidée et transmis vos connaissances.

Un grand merci aux anciens étudiants et stagiaires du Secteur des Bioprocédés pour tous les nombreux bons moments partagés ensemble, aussi bien scientifiques que personnels : Sven Ansoerge, Claire Chevalier, Laurence Delafosse, Alexandre Lennaertz, Mathias Mangion, Samuel Montcalm, Erica Schulze et Sabrina Yara.

Je remercie enfin ma famille pour son soutien malgré la distance et Florent pour m'avoir accompagnée dans cette mémorable aventure Outre-atlantique.

RÉSUMÉ

Depuis plus de 30 ans, les cellules HEK-293 sont très largement utilisées par la communauté scientifique. Ces cellules, pouvant être cultivées en suspension dans du milieu sans sérum, représentent actuellement un des systèmes le plus efficace pour la production de protéines recombinantes et de vecteurs viraux par transfection à grande échelle. Cette lignée cellulaire est ainsi la plus employée pour la production d'adénovirus et adénovirus-associés, ainsi que de rétrovirus et lentivirus, et ce à des fins de thérapie génique. Plusieurs vecteurs viraux produits dans les cellules HEK-293 sont déjà en études cliniques de phases II et III. Une protéine produite par la compagnie Ely Lilly est même déjà commercialisée.

Alors que les virus influenza de types A et B sont responsables chaque année d'épidémies de par le monde, les vaccins antigrippaux sont toujours produits sur des œufs embryonnés de poulet, malgré les importants désavantages que présente cette méthode. Alors même que les possibilités d'émergence de nouvelles pandémies sont très élevées, avec pour exemple récent celui de la grippe « porcine », il devient nécessaire de trouver de nouvelles alternatives rentables de production de ce vaccin à la fois plus sûres, plus rapides et plus efficaces. La culture de cellules de mammifères MDCK et VERO est déjà considérée depuis plusieurs années pour la production de souches virales d'influenza. Cependant ces lignées cellulaires présentent le désavantage notoire d'être cultivées en adhérence et dans un milieu contenant du sérum. Les cellules PER.C6 sont également à l'étude par la compagnie Sanofi Pasteur, mais aucune donnée sur le sujet n'a été publiée à ce jour. Différents laboratoires utilisent déjà les cellules HEK-293 en co-culture avec des MDCK afin de « récupérer » des souches influenza.

Le but de cette étude était d'évaluer l'efficacité d'une plateforme d'expression utilisant les cellules HEK-293 pour la production de vaccin contre influenza. Les expériences ont été réalisées avec ces cellules cultivées en suspension dans du milieu sans sérum. Les premières études ont permis de mettre en évidence la présence des deux récepteurs de surfaces du virus (Sia2-3Gal et Sia2-6Gal) sur les cellules et donc le potentiel de ces cellules à être infectées. Les premières infections, réalisées en parallèles sur MDCK et HEK-293, ont confirmé cette hypothèse par l'obtention de titres viraux d'intérêt (640 HA/mL, 10^6 IVP/mL), bien que moindre à ceux obtenus avec la lignée de référence MDCK (2560 HA/mL, 10^{10} IVP/mL). Les objectifs suivants consistaient à optimiser les paramètres d'infection afin d'obtenir la meilleure production possible,

puis d'adapter le virus à la souche cellulaire. L'effet de la trypsine sur les cellules durant l'infection à tout d'abord été étudiée. Les meilleurs résultats de production ont été obtenus pour une concentration de 1 $\mu\text{g/mL}$, qui permettait d'activer le virus sans effet inhibiteur sur les cellules. L'étude de la multiplicité d'infection (moi) a mis en avant qu'une moi basse (10^{-3}) permettait de mieux amplifier la souche virale en minimisant l'entrée en apoptose des cellules non infectées durant l'infection. Dans ces conditions d'infection (1×10^6 cell/mL, 1 $\mu\text{g/mL}$ trypsine, moi= 10^{-3}), les titres HA ont pu être multipliés par 4, équivalents alors les titres obtenus pour les cellules MDCK, et les titres infectieux ont été augmentés d'un facteur 100 pour atteindre 10^8 IVP/mL. Les cellules HEK-293 se sont également révélées capables d'amplifier efficacement différentes souches virales influenza de types A/H1N1, A/H3N2 et B. L'adaptation du virus à la lignée cellulaire est un autre paramètre critique, puisque en fonction de la souche, une augmentation des titres HA et infectieux a été observé pour les même conditions de culture pour différentes souches jusqu'à 10^{10} IVP/mL. De plus, l'effet de la densité cellulaire à l'infection a montré qu'une densité de 4×10^6 cell/mL permettait de multiplier par 4 le titre HA final (10 240 HA/mL) et par encore 1 log le titre infectieux (10^9 IVP/mL). Cette étude a également permis de mettre en évidence la capacité du milieu SFM4Transfx-293 (HyQ) à supporter à la fois la croissance cellulaire à haute densité et l'infection. Ces résultats, obtenus à petite échelle, ont été reproduits également en bioréacteur de 3-L, sans changement de milieu avant infection. Les premières étapes de purification nous ont permis d'isoler le virus et sa caractérisation a mis en évidence que les particules influenza produites sur cellules HEK-293 étaient très pléomorphes et présentaient bien toutes les caractéristiques antigéniques requises. Ces résultats suggèrent donc que la plateforme d'expression HEK-293 est clairement envisageable pour la production à grande échelle du vaccin influenza.

ABSTRACT

HEK-293 cell lines have been widely used for over 30 years by the scientific community. Currently HEK-293 cells are the most efficient system for the production of r-proteins and viral vectors by large-scale transfection of suspension-growing cells in serum-free medium. It is the most established cell line for the production of adeno- and adeno-associated viruses, retro- and lentiviruses for gene therapy applications. Numerous viral vectors produced in HEK-293 cells are currently involved in phase II and phase III clinical trials. Noteworthy, a protein manufactured by Ely Lilly using an HEK-293 clone has been approved for commercialization.

Influenza A and B viruses cause annual epidemics in the human population worldwide. Influenza vaccines are still produced using embryonated hen eggs despite important drawbacks. Considering the high probability of new influenza pandemics, like the recent swine flu H1N1, there is a need to find new alternative production methods for influenza vaccines. Mammalian cells such as MDCK or VERO have been considered for the production of influenza viral strains. However these strains present significant disadvantages of being cultivated in adherence and in serum containing medium. The human cell line PER.C6 is currently employed by Sanofi-Pasteur, but no data has been released to date. In many laboratories, HEK-293 clones have been used in combination with MDCK cells to rescue the influenza strains.

This study was designed primarily to evaluate if the HEK-293 cell line could efficiently replicate the influenza virus. Experiments were performed in serum-free suspension cultures. Preliminary studies consisted in investigating the presence of Sia2-3Gal and Sia2-6Gal receptors on the cell surface to evaluate the potential of HEK-293 cells to be infected. First infections, done on both MDCK and HEK-293 cells, confirmed this hypothesis by leading to interesting viral titers (640 HA/mL, 10^6 IVP/mL), even though lower than those obtained with the MDCK reference cell line (2560 HA/mL, 10^{10} IVP/mL). Optimization of infection parameters to reach best yields and adaptation of the virus to the cell line were the next points investigated. The effect of trypsin on cells during infection was first studied. Best production was obtained at a $1\mu\text{g/mL}$ concentration, which allowed virus activation without inhibiting effect on the cells. Low multiplicity of infection ($\text{moi}=10^{-3}$) at infection efficiently amplified the virus strain without leading non-infected cells to apoptosis. The infection conditions (1×10^6 cell/mL, $1\mu\text{g/mL}$ trypsin,

moi= 10^{-3}) allowed increased HA titers by 4, reaching HA titers equivalent to MDCK, and increased infectious titers by 2 logs to reach 10^8 IVP/mL. HEK-293 cells were also capable of producing high titers of infectious influenza viruses for different subtypes and variants, including A/H1, A/H3 and B strains, to up to 10^{10} IVP/mL. The study of cell density effects lead to the observation that a density of 4×10^6 cell/mL at infection allowed to multiply by 4-fold the HA titer (10,240 HA/mL) and increase by one log the infectious titer (10^9 IVP/mL). This study also showed that SFM4Transfx-293 (HyQ) medium could support both cell growth to high density, followed by infection. These results were validated at small and large scale (3-L bioreactor), without medium exchange prior to infection. First purification steps isolated the virus, and its characterization indicated that pleomorphic influenza particles produced in HEK-293 cells presented well all the virus characteristics needed to infect cells and replicate. Therefore, it is concluded that the HEK-293 expression platform may be a suitable system for industrial manufacturing of influenza vaccines.

TABLE DES MATIÈRES

DÉDICACE.....	III
REMERCIEMENTS	IV
RÉSUMÉ.....	V
ABSTRACT	VII
TABLE DES MATIÈRES	IX
LISTE DES TABLEAUX.....	XIII
LISTE DES FIGURES	XIV
LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS	XV
LISTE DES ANNEXES.....	XVII
INTRODUCTION.....	1
CHAPITRE 1 BIOLOGIE DU VIRUS INFLUENZA - VIRUS DE LA GRIPPE	5
1.1 Un virus familial	5
1.2 Symptômes et modes de transmission.....	5
1.3. Typologie	6
1.4 Composition et morphologie	8
1.5 Réplication du virus	10
1.6 Changements antigéniques.....	11
1.7 Epidémiologie	13
1.8 La vaccination, une méthode préventive	15
1.8.1 Principe de la vaccination	16
1.8.2 Types de vaccins	16
1.8.3 Traitements actuels disponibles	17
1.8.4 Méthode de production traditionnelle en œufs embryonnés	18

1.8.5	Un marché en pleine expansion	19
CHAPITRE 2 LA CULTURE CELLULAIRE : UNE MÉTHODE ALTERNATIVE DE		
PRODUCTION.....		20
2.1	Le défi de la production de vaccin	20
2.2	Possibilités qu'offre la culture de cellules.....	21
2.2.1	La lignée cellulaire	22
2.2.2	Le type de vaccin.....	22
2.3	Les lignées cellulaires utilisées comme système de production	23
2.3.1	Les cellules adhérentes.....	24
2.3.2	Les cellules en suspension.....	30
2.3.3	Les autres lignées candidates	31
2.4	Les cellules HEK-293 offrent une alternative d'intérêt	33
CHAPITRE 3 MATÉRIEL ET METHODES		34
3.1	Lignées cellulaires.....	34
3.1.1	Cellules HEK-293	34
3.1.2	Cellules MDCK.....	34
3.2	Choix du milieu de culture des cellules HEK-293	35
3.2.1	Etudes préliminaires	35
3.2.2	Préparation du milieu HyQ TransFx	35
3.3	Souches virales influenza	36
3.4	Méthodes de culture et d'infection.....	37
3.4.1	Maintenance des cellules HEK-293	37
3.4.2	Maintenance des cellules MDCK.....	37
3.4.3	Infection des cellules HEK-293	37

3.4.4	Infection des cellules MDCK.....	38
3.5	Méthode de purification	39
3.6	Méthodes de quantification et de détection.....	40
3.6.1	Test de détection Sia2-3Gal et Sia2-6Gal	40
3.6.2	Détection par immunofluorescence (Kit IMAGEN™).....	40
3.6.3	Test d'hémagglutination (test HA).....	42
3.6.4	Test d'infectivité (test TCID ₅₀)	43
3.6.5	SDS-PAGE et Western blot	45
3.6.6	Microscopie électronique (NSEM)	46
CHAPITRE 4 PRODUCTION ADAPTABLE À DIFFÉRENTES ÉCHELLES DU VIRUS		
INFLUENZA DANS DES CELLULES HEK-293 POUR UNE PRODUCTION EFFICACE		
DE VACCIN.....		
4.1	Présentation de l'article	47
4.2	Scalable Production of Influenza Virus in HEK-293 Cells for Efficient Vaccine Manufacturing	47
4.2.1	Abstract	48
4.2.2	Introduction	48
4.2.3	Materials and methods	51
4.2.4	Results and discussion.....	56
4.2.5	Conclusion.....	73
4.2.6	Acknowledgments	74
4.2.7	References	74
4.3	Expériences et résultats complémentaires d'infection	80
4.3.1	Effet du changement de température.....	80

4.3.2	Effet de la trypsine (titres infectieux).....	81
4.3.3	Comparaison de croissance et de production lors du changement d'échelle, avec changement de milieu à l'infection.....	82
4.3.4	Résultats complémentaires de purification	84
DISCUSSION GÉNÉRALE		86
CONCLUSION		88
BIBLIOGRAPHIE		90
ANNEXES		104

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1.1: Grille récapitulative des pandémies connues.	14
Tableau 2.1. Principales lignées en cours d'étude pour la production d'influenza.....	25
Table 4.1: Preliminary evaluation of different influenza strains.....	64
Table 4.2: Virus adaptation to HEK-293 cells.	64
Table 4.3: Specific production of influenza virus in HEK-293 cells.....	68

LISTE DES FIGURES

Figure 1.1: Nomenclature du virus Fujian.	7
Figure 1.2: Représentation schématique du virus influenza	9
Figure 1.3: Morphologies variées du virus influenza en microscopie électronique : particules quasi-sphériques, pléomorphes ou filamenteuses	9
Figure 1.4: Cycle de réplication du virus influenza.	10
Figure 1.5: Cassures antigéniques par hybridation.	12
Figure 3.1: Croissance cellulaire des HEK-293 dans différents milieux de culture.	36
Figure 3.2: Lecture de plaque HA.	43
Figure 3.3: Lecture de plaque TCID ₅₀	44
Figure 4.1: Expression of Sia2-3Gal and Sia2-6Gal receptors on the surface of HEK-293 cells..	57
Figure 4.2: Monitoring of influenza virus propagation by immunofluorescence.	58
Figure 4.3: Effect of trypsin on influenza virus production.	60
Figure 4.4: Effect of moi on influenza virus production.	61
Figure 4.5: A/PR/8/34 morphology produced in HEK-293 cells.....	66
Figure 4.6: SDS-PAGE and Western blot analysis of influenza A/PR/8/34.....	67
Figure 4.7: Effect of cell density at infection.	69
Figure 4.8: Influenza production in 3-L bioreactor.....	71
Figure 4.9: Croissance comparative des HEK-293 à 35 et 37°C.....	80
Figure 4.10: Effet de la trypsine sur les titres infectieux.	81
Figure 4.11: Changement d'échelle et production, avec changement de milieu avant infection..	83
Figure 4.12: Images du virus influenza A/PR/8/34 par microscopie électronique (NSEM).....	84

LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS

Ac	Anticorps
AS	Avec sérum
Ca	« Cold adapted »
CDC	Center for Disease Control
GMP	Good Manufacturing Practices
HA	Hémagglutinine
HA test	Test d'hémagglutination
HEK	Human Embryonic Kidney cells
IVP	Infectious Viral Particles
MDCK	Madin Darby Canine Kidney cells
Min	Minute(s)
Moi	Multiplicity of Infection
M1, M2	Protéines Matrices 1 et 2
NA	Neuraminidase
NP	Nucléoprotéine
NS1, NS2	Protéine non-structurales 1 et 2
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
PA	Polymérase acide
p.i.	Post infection
PB1, PB2	Polymérases basiques 1 et 2
PER.C6	Human Embryonic Retinal cells
RNP	Ribonucléoprotéine
SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis

SS	Sans sérum
TCID ₅₀	50% Tissue Culture Infective Dose
VERO	Monkey kidney cells
VLP	Virus-Like particles
WHO	World Health Organisation

LISTE DES ANNEXES

ANNEXE 1 – ÉCHELLE DES PHASES PANDÉMIQUES.....	104
ANNEXE 2 – SÉLECTION DE VIRUS RÉASSORTANTS.....	105

INTRODUCTION

Contexte et problématique

Le virus influenza est un virus enveloppé appartenant à la famille des *orthomyxoviridae* (Nayak, 2004). Ce virus, responsable de la grippe, sévit lors d'épidémies saisonnières et affecte majoritairement les jeunes enfants et les personnes âgées. Chaque année, il est ainsi responsable de la mort de plusieurs centaines de milliers de personnes à travers le monde. Cette maladie, souvent banalisée mais dont le coût sanitaire seulement aux USA est estimé entre US\$ 71-167 milliards par an (Belsey, 2006 A), s'avère être un problème majeur de santé publique à l'échelle mondiale.

Or, depuis 1940, la méthode de fabrication du vaccin de la grippe est demeurée inchangée et repose toujours sur la production de particules virales dans des œufs embryonnaires de poulet. Cette méthode, établie depuis plusieurs décennies, offre l'avantage d'un procédé complètement validé qui se déroule dans le respect des normes pharmaceutiques mondiales (Good Manufacturing Practices). Les installations réglementées déjà en place pour la production sur les œufs permettent de produire suffisamment de doses pour vacciner annuellement près de 14% de la population mondiale contre la grippe saisonnière (Leroux-Roels, 2009). Cependant, bien que complètement validée, cette méthode de production dans les œufs présente de nombreux désavantages qui se répercutent notamment sur la capacité de production et l'efficacité du produit.

Tout d'abord cette méthode est très longue et fastidieuse, puisqu'il faut de 6 à 9 mois, à partir d'une souche préalablement sélectionnée, pour produire les premières doses vaccinales. L'OMS est donc chargée de prédire plus d'un an à l'avance la composition du futur vaccin (Fukuda, 2009). Or l'instabilité des souches circulantes augmente le risque de divergence avec les souches qui composent le vaccin, ce qui peut fortement réduire l'efficacité de ce dernier. Ce délai de production restreint également la capacité de réponse face à une situation de crise (pandémie),

plus particulièrement si la souche est d'origine aviaire et ne peut être cultivée dans les œufs, comme c'est le cas avec H5N1 (Fedson, 2003). Actuellement, la production sur œufs de poule permet de fournir environ 350 millions de doses par an. A raison de 1 à 2 œufs par dose, cette méthode nécessite donc une très grande quantité d'œufs, ce qui limite fortement la capacité de production. Même si la fédération internationale des fabricants pharmaceutiques estime que la quantité de vaccins produits par an passera à 1 milliard de doses en 2010 (Leroux-Roels, 2009), la production de vaccin est déjà hautement tributaire de l'approvisionnement et de la qualité des œufs chaque année, laissant craindre une pénurie en cas de pandémie (offre limitée) ou d'épidémie chez les poulets. Par ailleurs, chaque œuf est inoculé avec des souches virales actives, ce qui oblige les industriels à mettre en place des infrastructures et des procédures de sécurité contraignantes et coûteuses (Leroux-Roels, 2009). La culture sur œufs peut enfin conduire à une adaptation du virus, modifiant ainsi ses épitopes et donc l'efficacité de l'immunisation induite (Monto, 2009). Finalement, la présence de contaminants résiduels tels que les protéines de l'œuf sont à l'origine de réactions allergiques importantes chez certaines personnes.

Dans ce contexte et afin de pouvoir répondre efficacement à la demande en cas de pandémie (dont la grippe porcine est un exemple récent), il est d'intérêt notoire de trouver de nouvelles méthodes de production tout aussi sécuritaires, plus robustes et surtout beaucoup plus rapides que la méthode traditionnelle.

Depuis plusieurs années, la culture de cellules est une technologie établie et reconnue pour la production de protéines thérapeutiques ou de vaccins par l'industrie pharmaceutique. Cette technique permet notamment la production en enceinte fermée et parfaitement contrôlée du produit d'intérêt, avec un passage facilité du procédé à l'échelle industrielle. Elle permet également de produire des protéines ou virus d'intérêt dans un temps record, allant de quelques jours à quelques semaines (en fonction du type de cellules, du produit d'intérêt et du procédé mis au point). Ainsi, il faut environ 12 semaines à Novavax, une compagnie travaillant avec des cellules d'insectes, pour produire un vaccin recombinant (Rios, 2006). Ces délais réduits permettraient donc de répondre plus efficacement à la demande accrue en vaccins dans le cas d'une pandémie. La culture de cellules semble donc toute indiquée comme alternative à la production dans les œufs.

C'est pourquoi plusieurs équipes de recherche travaillent sur le développement et l'optimisation de procédés de production et de purification du virus influenza dans des cellules, notamment de mammifères puisqu'elles offrent une meilleure représentation du système humain. Les vaccins produits par leur intermédiaire induisent généralement une meilleure réaction immunitaire tout en évitant les réactions allergiques pouvant être occasionnées avec la méthode des œufs (Pau, 2001). Plusieurs groupes pharmaceutiques développent ainsi de nouveaux procédés et poursuivent des essais cliniques pour tester de nouveaux vaccins dérivés de lignées cellulaires telles que : MDCK (Madin Darby Canine Kidney, Chiron), PER.C6 (Human embryonic retinal cells, Aventis Pasteur) ou VERO (African green monkey kidney cells, Baxter) (Rios, 2006). Cependant, les taux de production de particules virales observés chez ces cellules se trouvent en général être inférieurs à ceux obtenus avec la méthode traditionnelle des œufs. Seules les cellules MDCK produisent des titres viraux équivalents aux œufs (10^9 PFU/mL) (Bardiya, 2005). Cette lignée cellulaire, devenue lignée de référence dans le domaine (URL WHO), présente cependant deux importants désavantages. D'une part, ces cellules se cultivent en adhérence ce qui complique le processus de mise à l'échelle des procédés. D'autre part, elles requièrent l'ajout de sérum dans les milieux de culture, ce qui pose des problèmes au niveau de la purification et de la sécurité du produit, le sérum étant d'origine animale et de composition variable et inconnue (Youil, 2004).

Objectifs

Les cellules HEK-293 (Human Embryonic Kidney) sont déjà largement utilisées depuis plus de 30 ans par la communauté scientifique, principalement pour la production de vecteurs viraux et de protéines recombinantes par transfection (Côté, 1998 ; Durocher, 2002). Cette lignée cellulaire est documentée et offre l'avantage d'être cultivée en suspension, en absence de sérum, à de très hautes densités cellulaires (jusqu'à 10^7 cellules/mL en mode batch). L'objectif général est de développer une méthode alternative de production à haut rendement de ce virus, via un procédé de culture de cellules HEK-293, pouvant être transposable par la suite à l'échelle industrielle.

Cet objectif sera rempli par l'atteinte des objectifs spécifiques suivants :

- Optimiser en flacons les principaux paramètres d'infection des cellules par le virus influenza (moi, concentration de trypsine, densité cellulaire, temps de récolte) ;
- Mettre au point des méthodes de détection et de quantification fiables du virus ;
- Purifier et caractériser les particules virales afin de vérifier leur intégrité;
- Transposer la méthode à un bioréacteur de 3L pour valider une première étape du changement d'échelle.

Organisation du Mémoire

Ce mémoire de maîtrise se compose d'une introduction, de quatre chapitres principaux suivis d'une section de discussion générale, conclusion et recommandations.

Les deux premiers chapitres font la revue de la littérature abordant à la fois les généralités concernant le virus influenza (la maladie et la vaccination, les différents variants, son mode de réplication,...) et les méthodes actuelles de productions du virus avec leurs avantages et leurs inconvénients. En présentant l'état des recherches actuelles, ces premiers chapitres nous permettent d'établir le contexte qui mène à la problématique du sujet : trouver une nouvelle méthode alternative de production du vaccin de la grippe. Le troisième chapitre détaille le Matériel et Méthodes, ainsi que certaines expériences préliminaires. Le quatrième chapitre regroupe enfin les résultats et est présenté sous forme d'un article qui a été accepté par le journal scientifique *Vaccine* avec comité de lecture. Dans cet article, intitulé *Scalable Production of Influenza Virus in HEK-293 Cells for Efficient Vaccine Manufacturing*, est expliqué le travail de recherche mené pour l'étude et l'optimisation des conditions de production du virus influenza dans des cellules de mammifères HEK-293, les méthodes de détection et de quantification, les premières étapes de purification, ainsi que certaines expériences complémentaires.

CHAPITRE 1 BIOLOGIE DU VIRUS INFLUENZA - VIRUS DE LA GRIPPE

1.1 Un virus familial

Le virus influenza, responsable de la grippe, sévit régulièrement lors d'épidémies saisonnières et plus occasionnellement lors de pandémies. Ce virus a notamment été à l'origine de l'une des plus terribles pandémies chez l'homme au début du 20^{ème} siècle. La « grippe espagnole » de 1918-1920 a en effet causé la mort de plus de 20 millions de personnes, soit plus de morts que durant toute la première guerre mondiale (Beveridge, 1991). Annuellement, l'Organisation Mondiale de la Santé estime que ce virus est responsable de 3 à 5 millions de cas graves et de 250 à 500 000 décès de par le monde. Uniquement en Amérique du nord, cette estimation se porte à près de 20 000 morts chaque année, principalement chez les personnes âgées, les jeunes enfants ou les déficients immunitaires. Malgré la disponibilité de vaccins et de traitements antiviraux, le virus influenza continue de faire des victimes, principalement à cause de sa capacité à déjouer nos défenses immunitaires.

1.2 Symptômes et modes de transmission

La grippe s'avère une maladie très sévère pour tous les groupes d'âge, accompagnée des symptômes suivants : mal de gorge, toux, fièvre, migraine, frissons, fatigue, faiblesse, malaises et courbatures (Eccles, 2005). Dans les cas les plus sérieux, la maladie peut dégénérer en pneumonie et être fatale, particulièrement pour les personnes des groupes à risques (personnes âgées, jeunes enfants, immuno-supprimés, malades chroniques, femmes enceintes...).

Le temps d'incubation du virus est de 1 à 3 jours et la période de contagion débute 24 heures avant l'apparition des premiers symptômes et se poursuit jusqu'à 7 jours après le début de la maladie (Santé et Service Sociaux du Québec, Pandémie de grippe). Une personne atteinte de la grippe ne peut généralement pas quitter son lit pendant 3 jours et peut mettre de quelques jours à

plusieurs semaines à se rétablir. Cette maladie est souvent confondue avec le rhume commun, qui n'est qu'une infection moyenne du système respiratoire supérieur, causé par des virus respiratoires tels les rhinovirus ou les coronavirus (Eccles, 2005).

La grippe se transmet facilement dans l'air par éternuements ou reniflements, via les aérosols contenant des particules virales. Le virus peut également être transmis par contact direct via des sécrétions ou des surfaces contaminées (Brankston, 2007). Le temps de survie du virus varie en fonction de la surface : allant de 1-2 jours sur une surface dure et non poreuse (plastique, métal...), 15 minutes sur un tissu sec (manteau, draps...) à 5 minutes sur la peau. Son temps de survie peut être considérablement rallongé si le virus se retrouve protégé dans un film tel du mucus (jusqu'à 17 jours sur un billet), ou pratiquement infini si congelé (NZHerald, 2006 ; Lowen, 2007). Le virus influenza est cependant relativement fragile et peut donc être inactivé facilement par la chaleur (60 minutes à 56°C) et par la plupart des produits chimiques usuels (désinfectants, détergents...) (Suarez, 2003).

1.3. Typologie

Les virus influenza sont généralement regroupés en 3 classes de type A, B ou C (Kawaoka, 2006 ; Wagner, 2008).

Les virus de type A sont communs à beaucoup de mammifères et d'espèces aviaires, qui sont leurs hôtes naturels. Parmi les 3 types, ces virus A se révèlent les plus virulents chez l'homme et sont à l'origine de la plupart des épidémies saisonnières et des pandémies de grippe. De ce fait, ils sont également le type le plus étudié et le mieux connu. Les virus de types A sont sous-divisés en sérotypes en fonction de leurs différences antigéniques (Johanson, 2007). Il existe, dans la nature, 16 hémagglutinines et 9 neuraminidases, qui sont deux importantes glycoprotéines de surface du virus influenza de type A. Les sous-types d'influenza sont désignés par ces protéines « H » et « N ». Même si toutes les hémagglutinines peuvent infecter les oiseaux, jusqu'à maintenant, seules les souches H1, H2 et H3 ont été associées à la maladie étendue chez l'humain et les souches H5, H7 et H9 ont démontré la capacité de causer une maladie chez l'humain.

Le virus de type B infecte exclusivement l'homme et peut aussi être responsable d'épidémies saisonnières, bien qu'il soit beaucoup moins commun que le virus de type A (Hay, 2001). Ce type de virus mute 2 à 3 fois plus lentement que le type A et est conséquemment moins diversifié génétiquement (Nobusawa, 2006). C'est pour cela qu'un seul sérotype est à ce jour identifié. Cette diversité génétique restreinte permet d'obtenir une immunité dès un très jeune âge, mais le virus mute suffisamment pour qu'elle ne soit pas définitive. Ce taux réduit de mutation et le nombre d'hôtes limités (limitant les croisements inter-espèces) font que ce type n'a jamais été à l'origine de pandémie.

Le virus de type C peut infecter à la fois les humains, les chiens et les porcs, créant occasionnellement des épidémies locales ou des maladies sévères (Taubenberger, 2008). Toutefois, influenza C n'est pas saisonnier et est moins répandu que les 2 autres types. Il ne cause généralement que des maux réduits chez les enfants.

La nomenclature d'un virus influenza permet d'identifier à la fois le type, le sous-type, l'année d'isolement et le lieu d'origine de la souche (Fig1.1).

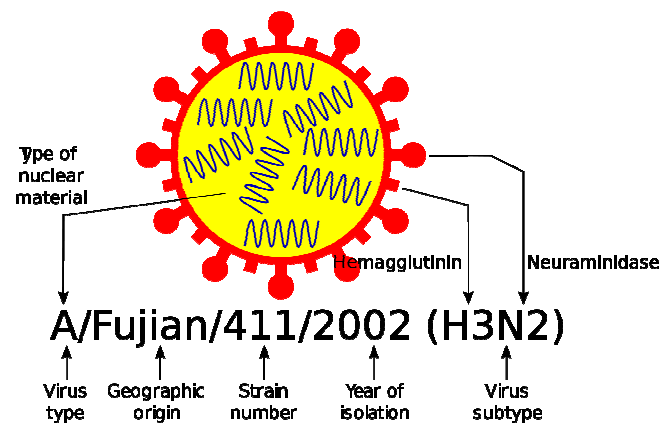


Figure 1.1: Nomenclature du virus Fujian. (Wikipedia)

1.4 Composition et morphologie

Les virus influenza sont des virus enveloppés, de 80-120 nm de diamètre, appartenant à la famille des *orthomyxoviridae* (*ortho* = droit, *myxo* = mucus), nommés ainsi parce qu'ils se fixent aux résidus sialiques Sia2-3Gal (de type aviaire) et Sia2-6Gal (de type humain) des mucoprotéines des cellules épithéliales. Ils présentent tous une organisation structurale et un mode de réplication similaires (Acheson, 2006 ; Nayak, 2004; Nayak, 2009).

La particule virale est constituée d'une enveloppe lipidique, issue de la cellule hôte, hérissée de spicules formés par les glycoprotéines de surface (Fig 1.2). Les virus A et B possèdent deux glycoprotéines de surface, l'hémagglutinine (HA) et la neuraminidase (NA). Dans le cas du virus de type C, il n'y a qu'une sorte de spicule à la surface de la particule virale, qui assure les fonctions à la fois de l'hémagglutinine et d'estérase.

L'hémagglutinine, qui représente environ 40% des glycoprotéines de surface, est formée par l'association de deux sous unités, HA1 et HA2, reliées par un pont disulfure. L'association de trois monomères HA forme un spicule d'hémagglutinine à la surface de la particule virale. L'hémagglutinine permet la fixation du virus sur les acides sialiques situés en surface des cellules de l'épithélium cilié (tractus respiratoire supérieur). Elle est très immunogène et induit la production d'anticorps dont certains peuvent être neutralisants. La neuraminidase (ou N-acetyl-neuraminyl-hydrolase), est une sialidase présente sous la forme d'homotétramères à la surface de la particule virale. Elle permettrait la libération des virions néoformés par la lyse des acides sialiques à la surface de la cellule (Laver, 1969; Laver, 2002 ; Harris, 2006).

En plus des glycoprotéines de surface, l'enveloppe virale est constituée de deux autres protéines virales : la protéine de matrice, M1, qui sous-tend l'ensemble de l'enveloppe virale et la protéine M2 qui joue le rôle de canal ionique pour les virus de type A. Pour les virus de sous-type B, une protéine de surface NB s'insère dans la bicouche lipidique et assurerait des fonctions équivalentes à celles de la protéine M2 des virus de type A. Enfin, une protéine CM2 serait l'homologue pour les virus de type C.

À l'intérieur de la particule virale, le génome viral (~10-15 kDa) est présent sous la forme de sept (type C) ou huit (types A et B) nucléocapsides de symétrie hélicoïdale qui résultent chacune de

l'association d'une molécule d'ARN (simple brin négatif) et de nombreuses molécules de nucléoprotéine, NP. Cette protéine NP fait partie des antigènes internes du virus : elle détermine le type viral A, B ou C. Trois polymérase, PA, PB1-F2 et PB2, donnent le complexe réplécase/transcriptase associé aux nucléocapsides, qui forment le complexe ribonucléoprotéique (RNP). Enfin, les protéines non-structurales, NS1 et NS2, servent de protéines de régulation de la machinerie cellulaire et d'adressage (Nayak, 2004; Nayak, 2009).

Les particules virales influenza sont très pléomorphes et existent sous diverses formes allant de sphériques à filamenteuses (Fig1.3) (Harris, 2006).

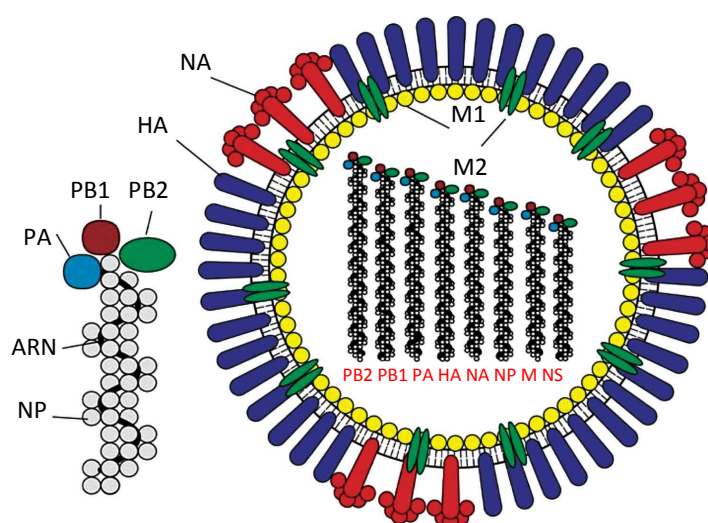


Figure 1.2: Représentation schématique du virus influenza et d'un complexe ribonucléoprotéique.

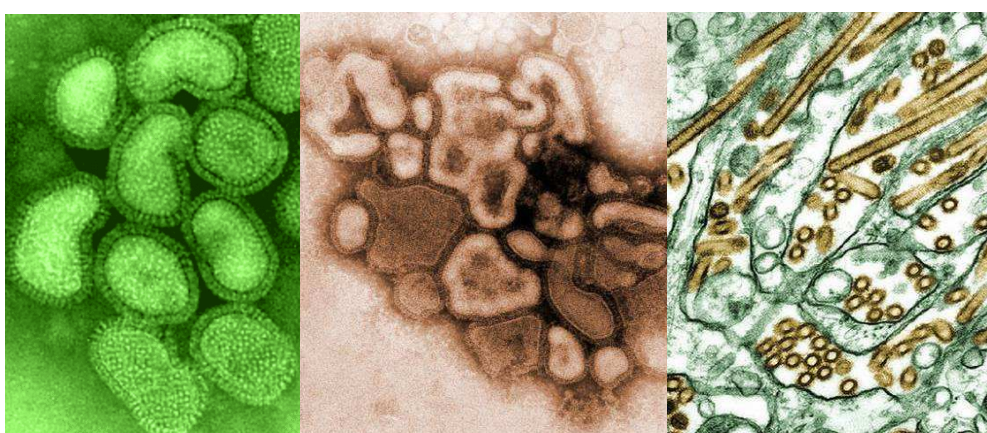


Figure 1.3: Morphologies variées du virus influenza en microscopie électronique : particules quasi-sphériques (gauche), pléomorphes (centre) ou filamenteuses (droite).

(Fig 1.2 : Cox, 2004 ; Fig 1.3 : URL : CTR, Medscape, Sciencelearn)

1.5 Réplication du virus

Le virus influenza infecte initialement les cellules épithéliales du tractus respiratoire supérieur. Il ne peut se répliquer que dans des cellules vivantes. L'infection et la réplication du virus se déroule en 5 étapes (Fig 1.4) (Acheson, 2006 ; Chazal 2003 ; Ludwig, 1999 ; Nayak, 2004; Nayak, 2009).

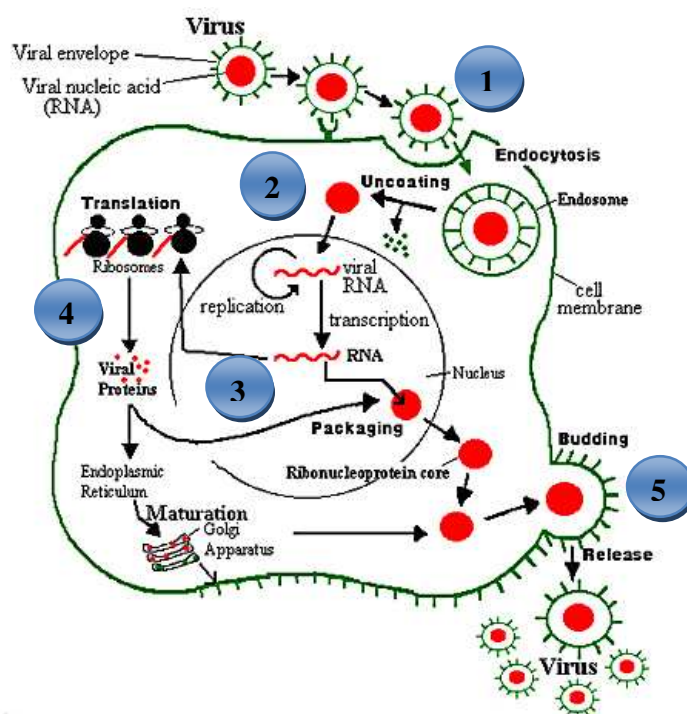


Figure 1.4: Cycle de réplication du virus influenza.

Fixation et endocytose du virus (1), fusion des membranes et libération du matériel viral dans le cytoplasme (2), réplication et transcription de l'ARN viral dans le noyau (3), synthèse et maturation des protéines virales dans le cytoplasme (4), assemblage et bourgeonnement des virions néoformés (5). (URL : Accessexcellence)

Tout d'abord, le virus influenza se fixe par l'intermédiaire de l'hémagglutinine sur les acides sialiques Sia2-3Gal et/ou Sia2-6 Gal présents à la surface de la cellule hôte. Le virus va être ensuite internalisé par endocytose après clivage de la glycoprotéine HA. Une fois à l'intérieur de la cellule, les canaux ioniques M2 vont permettre l'entrée de protons qui vont acidifier l'intérieur de la vésicule d'endosome et ainsi initier la fusion des enveloppes virale et cellulaire. Le matériel viral sera alors libéré dans le cytoplasme de la cellule. Les complexes RNP seront ensuite

transportés jusqu'au noyau de la cellule, où les ARN-polymérases vont commencer la réplication de copies du génome viral et la transcription en ARN brin positif, qui seront soit exportés dans le cytoplasme et traduits, soit conservés dans le noyau cellulaire. Pendant ce temps, la protéine non-structurale NS1 va réguler à la baisse la transcription d'ARNm cellulaires. Les protéines virales nouvellement synthétisées seront alors sécrétées à la surface de l'appareil de Golgi (pour HA et NA) ou ramenées dans le noyau pour fixer les ARN et former de nouveaux complexes viraux. Les glycoprotéines HA et NA seront exprimées à la surface de la cellule et vont se regrouper sous forme d'un renflement. Les complexes RNP nouvellement formés vont migrer du noyau jusqu'à ce renflement grâce à la protéine non structurale d'export NS2, et former ainsi un nouveau virion. Le virus mature va alors bourgeonner de la cellule dans une sphère phospholipidique constituée de la membrane de la cellule hôte. Le détachement du virion de la cellule va se faire grâce à la neuraminidase qui va cliver les acides sialiques présents à la surface de la cellule. Après la libération des nouvelles particules virales, la cellule hôte va mourir (Barber, 2001, Hinshaw, 1994 ; Takizawa, 1993).

1.6 Changements antigéniques

La grande variabilité du virus influenza permet de générer de nombreux variants pouvant être à l'origine de nouvelles pandémies. Contrairement à ce que l'on observe avec certains autres virus respiratoires, on ne peut être immunisé à vie contre influenza même après infection. Cela s'explique par la grande facilité avec laquelle les domaines antigéniques des glycoprotéines HA et NA du virus peuvent muter.

En effet, ces changements antigéniques peuvent se faire de deux façons : (1) lentement mais de manière continue (glissement antigénique), ou (2) très soudainement mais de manière occasionnelle (cassure antigénique) (Acheson, 2006 ; Wagner, 2008).

Les **glissements antigéniques** (ou « drift ») sont des changements lents qui s'opèrent à la surface du virus au cours du temps et qui résultent en l'accumulation de petites mutations au niveau des gènes codants pour les glycoprotéines. En effet, par l'absence d'enzyme de relecture, l'ARN

polymérase qui réplique le génome viral fait des erreurs : 1 tous les 10 000 nucléotides (~ taille du génome d'influenza). Une grande majorité des virus nouvellement synthétisés s'avèrent donc être des mutants. Ainsi, un nouveau variant peut être sélectivement propagé en fonction de sa capacité à se répliquer dans d'autres cellules infectées et de sa capacité à déjouer le système immunitaire de l'hôte. Ce mécanisme est commun à un grand nombre de virus à ARN et complique considérablement la mise au point de vaccins. Ces glissements antigéniques ont ainsi permis la génération de nombreux sous-types du virus influenza, principalement présents chez les oiseaux, totalisant 16 antigènes HA et 9 NA bien distincts.

Les **cassures antigéniques** (ou « shift ») sont le résultat de réassortiments de gènes viraux quand une cellule se retrouve infectée par deux ou plusieurs souches différentes. La cellule va alors produire des réassortants qui combineront une partie du génome de chaque souche et si un de ces réassortants peut se répliquer, il sera alors amplifié. Ces changements génétiques très rapides sont favorisés par la fragmentation du génome viral en 8 chromosomes ; ils permettent l'émergence de nouvelles souches recombinées pouvant être à l'origine de pandémie (Fig 1.5).

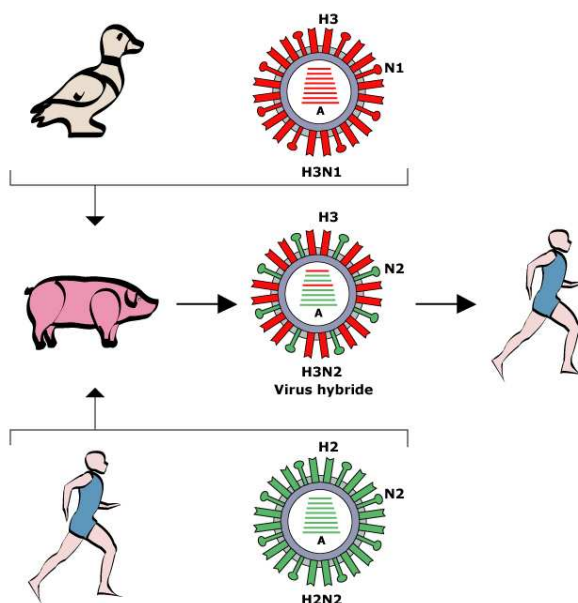


Figure 1.5: Cassures antigéniques par hybridation.

Le porc peut servir d'hôte intermédiaire simultanément à des souches d'origine humaine et aviaire et ainsi devenir le réservoir de nouveaux variants.

Ce genre de recombinaison entre souches d'origine animale et humaine peut créer un virus ayant la capacité de se répliquer chez l'homme et de se répandre rapidement grâce aux déterminants antigéniques d'origine animale, non reconnus par le système immunitaire humain. Ces cassures antigéniques n'arrivent que quelques fois au cours d'un siècle, mais les conséquences peuvent en être désastreuses. Il est important de noter que comme les oiseaux sont le réservoir naturel des virus de l'influenza, les personnes en contact étroit avec des volatiles infectés peuvent être sujettes aux contaminations par ces nouveaux virus. Les porcs, susceptibles d'être infectés par les virus grippaux humains et aviaires, peuvent devenir un vecteur du réassortiment en question, de même que les humains qui peuvent théoriquement agir aussi comme agents de mélange.

1.7 Epidémiologie

Les virus de l'influenza de type A causent périodiquement des épidémies mondiales, appelées pandémies, accompagnées de taux de mortalité élevés et pouvant se produire en tout temps. Ces pandémies sont imprévisibles. Les conditions suivantes doivent être réunies pour qu'un virus devienne pandémique : un nouveau virus de type A avec une modification génétique majeure, un virus virulent et ayant un fort potentiel morbide et mortel, une population réceptive qui possède peu ou pas d'immunité, ainsi qu'une transmission interhumaine efficace.

Trois pandémies majeures ont ainsi eu lieu au cours du 20^{ème} siècle, totalisant plus de 25 millions de morts (Tableau 1.1). Dans chaque cas, l'émergence d'une pandémie fut occasionnée par l'apparition d'une nouvelle souche virale humaine issue d'un mélange génétique (réassortiment) entre des virus de l'influenza humain et aviaire, additionnée de potentielles mutations cumulatives.

Tableau 1.1: Grille récapitulative des pandémies connues.

Nom	Dates	Nombre de morts	Sous-type	Index de sévérité pandémique (ANNEXE 1)
Grippe Russe	1889-1890	1 million	H2N2	NA
Grippe Espagnole	1918-1920	20-50 millions	H1N1	5
Grippe Asiatique	1957-1958	1-1.5 million	H2N2	2
Grippe Hong Kong	1968-1969	0.75-1 million	H3N2	2
Grippe Mexicaine (ou « porcine »)	2009- présent	15,300 au 15 fév 2010	H1N1	6

La « grippe espagnole » de 1918 est la plus connue et fut également la plus létale des pandémies. On estime entre 20 et 50 millions le nombre de victimes de cette pandémie, soit presque autant que la peste noire (Beveridge, 1991). Ce taux de mortalité important est attribué à un taux d'infection élevé (50%) et à des symptômes très sévères : hémorragie des membranes muqueuses du nez, de l'estomac et des intestins, saignements des oreilles et pétéchies hémorragiques. Ces symptômes étaient d'ailleurs si inhabituels qu'initialement, cette pandémie fut confondue avec la dengue, le choléra ou encore la typhoïde. Cette pandémie a tué entre 2 et 20% des personnes atteintes, contre 0.1% pour une grippe épidémique normale (Guerra, 1993). Un autre facteur inhabituel est que, contrairement aux épidémies usuelles qui touchent principalement les jeunes enfants (<2ans) et les personnes âgées (>70ans), celle-ci touchait en majorité les moins de 65 ans (99% des cas) avec 50% des morts compris dans la tranche des 20-40 ans (Patterson, 1991; Simonsen, 1998). Le nombre total de morts reste approximatif, mais il est estimé que près de 2.5 à 5% de la population mondiale a été emportée par cette pandémie.

De plus en plus de données scientifiques, notamment celles obtenues par le séquençage moléculaire, évoquent la possibilité que les 8 gènes du virus de la pandémie de 1918 aient tous été d'origine aviaire et que le potentiel de pandémie humaine ait été acquis à la suite d'une série de mutations (Wang, 2010). D'autres études ont été entreprises afin de mieux comprendre les facteurs expliquant la virulence et la transmissibilité du virus responsable de la pandémie de grippe de 1918. Les virus des pandémies de 1957 et de 1968 étaient également issus de réassortiment de gènes d'origine humaine et aviaire (Reid, 2003).

En 1997, la transmission directe de l'influenza aviaire H5N1 du poulet à l'homme a été démontrée lors de l'épisode de l'influenza aviaire de Hong Kong. La propagation du virus de l'influenza aviaire hautement pathogène H5N1 dans plusieurs pays asiatiques depuis 2003 a été associée à des cas humains sporadiques et à un taux de mortalité relativement élevé. La constitution génétique du virus H5N1 responsable des cas humains était quant à lui totalement aviaire (Sims, 2005). La souche aviaire a attiré l'attention générale par le risque encouru d'une nouvelle pandémie mondiale si elle évoluait jusqu'à une forme transmissible d'homme à homme. La majorité des nouvelles souches d'influenza émergent en Asie du Sud-Est, où d'importantes populations humaines sont en contact étroit avec des porcs et volailles.

De même, la nouvelle souche A/H1N1, ou "grippe porcine", qui a émergé début 2009 au Mexique avant de s'étendre aux différents continents était une combinaison de gènes viraux d'origine à la fois humaine, porcine et aviaire (CDC, 2009 ; Garten, 2009 ; Maines, 2009 ; Malik, 2009). L'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) a ainsi déclaré l'état de pandémie de niveau 6 le 11 juin 2009, comme indication de la rapidité et de l'étendue de propagation de la souche, et non de sa sévérité.

Il faut donc tenir compte du potentiel pandémique de tout nouveau virus, même si tous les nouveaux virus ne deviennent pas pandémiques.

1.8 La vaccination, une méthode préventive

1.8.1 Principe de la vaccination

La vaccination a vu le jour avec Jenner en 1796, puis Pasteur vers 1885, et s'est développée au cours des XIXe et XXe siècles. Partie d'une observation empirique d'immunité croisée entre deux maladies, la vaccine et la variole, la vaccination est devenue aujourd'hui une science à part entière. Elle représente un pilier majeur de la médecine préventive.

Le principe de la vaccination consiste à inoculer un agent pathogène infectieux atténué ou inactivé (antigène) chez un patient afin de déclencher une réaction immunitaire et d'induire la production d'anticorps dans l'organisme (Wagner, 2008). Cette réaction immunitaire primaire permettra d'une part de stimuler les défenses immunitaires, et en parallèle de garder en mémoire l'antigène présenté pour pouvoir réactiver l'immunité acquise plus rapidement lors d'une future contamination par le même agent pathogène. L'immunité acquise préviendra le développement de la maladie correspondante pendant une durée variable en fonction de la nature du pathogène et du type de vaccin administré.

Les vaccins contre la grippe sont utilisés depuis plus de 60 ans. Ils sont habituellement inoculés par injection intramusculaire, mais ils peuvent l'être par voie orale ou aérosol nasal (ex: vaccin antigrippal de la compagnie Nasvax en cours d'essai en Israël, vaccins contre la grippe saisonnière ou contre la grippe pandémique A/H1N1 déjà utilisés aux États-Unis). (URL : Nasvax ; URL : A/H1N1)

1.8.2 Types de vaccins

Il existe quatre types de vaccins dépendamment de leur composition (Ashkenazi, 2006; Belsey , 2006) :

Les vaccins issus d'agents infectieux inactivés (l'agent pathogène est inactivé chimiquement ou par la chaleur et ne peut plus induire de maladie chez le patient) ; Les vaccins issus d'agents

vivants atténués (agents ayant perdu leur caractère pathogène naturellement ou par mutation et ne pouvant plus développer la maladie, mais conservant leur capacité à induire des réponses immunitaires grâce à la présence des antigènes); Les vaccins constitués de sous-unités d'agents infectieux (contenant uniquement les constituants nécessaires au déclenchement de la réponse immunitaire : des glycoprotéines de surface purifiées par exemple) ; Les vaccins constitués de toxines inactivées (contenant uniquement des toxines inactivées à l'origine des symptômes de la maladie). De plus, divers additifs (adjuvants) peuvent renforcer la réaction immunitaire.

1.8.3 Traitements actuels disponibles

Actuellement, la meilleure protection pour une personne en bonne santé repose sur une bonne hygiène de vie et éventuellement une vaccination préventive afin de prévenir tout risque d'infection. Dans le cas de contraction de la grippe, il existe toutefois des traitements antiviraux (inhibiteurs à neuraminidases ou protéines M2) permettant de réduire les symptômes.

La majorité des vaccins contre la grippe disponibles actuellement sont issus de virus préalablement inactivés, entiers ou fragmentés (exemple : Fluzone). Seulement une petite part de ces vaccins commercialisés est issue de virus vivants atténués (exemple : FluMist) (Matthews, 2006). Ces vaccins sont des préparations trivalentes (TIVs) contenant le matériel viral purifié et inactivé de deux souches de type A et d'une de type B (Wagner, 2008 ; URL : CDC). Basée sur une surveillance épidémiologique à travers le monde, la composition du TIV est fixée chaque année par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) pour la saison à venir (Kitler, 2002). La composition standard est formulée à base de 15µg de HA pour chacune des souches qui constitueront la dose vaccinale. (Bardiya, 2005 ; Johansson, 2007). Le TIV ne présente aucun risque de transmission de la maladie et induit généralement une faible réaction de l'organisme (France, 2004). Leur efficacité varie de 70-90% chez une personne en bonne santé, à seulement 30-70% chez les personnes âgées. Cependant, le vaccin d'une année ne sera plus efficace l'année suivante à cause de la grande variabilité génétique des souches influenza circulantes.

1.8.4 Méthode de production traditionnelle en œufs embryonnés

Depuis 1940, la méthode de production des lots de vaccins antigrippaux est restée inchangée et repose sur la méthode des œufs embryonnés de poulets, qui consiste à inoculer le liquide allantoïque d'un œuf par une souche virale influenza et de laisser le virus s'accumuler dans le fluide. Après quelques jours d'incubation, les particules virales sont récoltées, purifiées, inactivées et mises en doses. Une moyenne de 1 à 2 œufs est nécessaire par dose vaccinale. Ce procédé nécessite 6 mois avant de produire les premières doses vaccinales, et près de 9 à 10 mois ensuite pour produire les vaccins et répondre à la demande mondiale (Bardiya, 2005; Scannon, 2006).

Isolement et amplification de la souche d'intérêt (6 mois)

En effet, une souche épidémique préalablement sélectionnée devra tout d'abord être co-cultivée dans les œufs en présence d'une autre souche influenza s'amplifiant à haut titre viral (généralement A/PR/8/34) afin de pouvoir la répliquer et obtenir des réassortants génétiques du virus. Ces réassortants seront alors triés pour isoler le recombinant qui présentera à la fois les antigènes HA et NA de la souche épidémique d'intérêt et le reste du génome de l'autre souche (exemple : A/PR/8/34) lui permettant de se répliquer à haut titre (ANNEXE 2). Ce réassortant sera donc récolté, et purifié avant d'être distribué aux fabricants de vaccins. Ces étapes de développement prennent plusieurs mois et sont à refaire chaque année pour toutes les nouvelles souches épidémiques sélectionnées.

Production industrielle de vaccins (9-10 mois)

Six mois avant la réception de la souche recombinante et le début de la production industrielle, les fabricants de vaccins doivent s'assurer d'avoir la quantité d'œufs nécessaire à la production du vaccin. A la réception de la souche recombinante, les industriels ont 3 à 4 mois pour produire les doses de vaccins. Les particules virales sont alors amplifiées dans des œufs puis récoltées, purifiées par centrifugation/filtration/chromatographie (détails des étapes de purification : Gerdil, 2003; Matthews, 2006; Wolff, 2008), puis inactivées chimiquement (formaldehyde, β -

propiolactone) (Bardiya, 2005; Wagner, 2008; Wolff, 2008). En fonction de la méthode d'inactivation utilisée, le produit final sera différent : virus entier inactivé (formaldehyde, β -propiolactone), virus fragmenté (ethyl ether, sodium dodecyl sulfate) ou sous-unités virales (détergents). Les études cliniques valideront la nouvelle formulation.

1.8.5 Un marché en pleine expansion

Jusqu'à tout récemment le marché des vaccins était relativement modeste lorsque comparé au marché pharmaceutique global. Mais alors que la consommation moyenne de médicaments dans le monde augmente de 5 % par an, le marché des vaccins croît de près de 15%. En 2008, l'industrie des vaccins représentait déjà 3% du marché pharmaceutique mondial et il devrait générer plus de 20 milliards de dollars en 2012 (Bonhineust, 2009). Avec une croissance régulière, les compagnies pharmaceutiques ont pris conscience du potentiel de ce marché et investissent comme le montrent les acquisitions récentes de Chiron par Novartis et de ID Biomedical par GlaxoSmithKline au courant de 2006, ou encore de Wyeth par Pfizer en 2009 (Belsey, 2006; URL :Pfizer). Actuellement, cinq groupes se partagent donc près de 90% du marché : GlaxoSmithKline, Sanofi-Pasteur, Pfizer (ex-Wyeth), Merck et Novartis (ex-Chiron).

Approximativement 250 millions de doses de vaccins contre la grippe saisonnière sont distribuées annuellement à travers le monde, mais plus de 450 millions de doses ont été commandées par seulement 7 pays (Allemagne, Canada, Espagne, France, Suisse, Royaume-Uni et USA) pour prévenir la grippe pandémique A/H1N1 de 2009. Le vaccin contre la grippe représentait déjà 14% des ventes totales de vaccins en 2004, et pourrait générer plus de 2,7 milliards d'euros en 2010 (Belsey, 2006).

CHAPITRE 2 LA CULTURE CELLULAIRE : UNE MÉTHODE ALTERNATIVE DE PRODUCTION

Les vaccins antigrippaux sont traditionnellement produits dans les œufs. Cependant depuis une dizaine d'années, les autorités et les fabricants pharmaceutiques cherchent à développer la culture de cellules comme nouveau support de production pour les vaccins. Actuellement, trois de ces vaccins produits grâce aux lignées cellulaires MDCK, Vero et PER.C6 sont en étude clinique alors même que les premières licences pour les vaccins saisonniers et pandémiques contre H5N1 ont été accordées.

2.1 Le défi de la production de vaccin

A ce jour, en plus du vaccin saisonnier, des vaccins pré-pandémiques et pandémiques peuvent être nécessaires. Les vaccins pandémiques doivent pouvoir être produits dans un temps record dès l'isolement de la souche virale émergente. Les approches de production consistent alors à produire un réassortant à haut rendement en utilisant soit les méthodes conventionnelles de génération de réassortants décrites précédemment (ANNEXE 2) ou encore attendre la croissance du virus de type sauvage dans des installations de biosécurité de niveau 3 et plus (Howard, 2008). Des lignées cellulaires peuvent alors être utilisées pour l'isolement de souches influenza, qui sont ensuite fournies aux fabricants pour la production dans les œufs. Cependant, les fabricants doivent souvent amplifier ces souches via de nombreux passages dans les cellules ou les œufs afin de sélectionner un réassortant à haut rendement, ce qui nécessite beaucoup de temps.

La génétique inverse est une autre approche de production qui consiste à reproduire un virus (infectieux ou non) par transfection de cellules, à partir de différents plasmides ADNs contenant le génome viral. Actuellement, ces méthodes de génétique inversée utilisent 12-, 8-, ou 4-plasmides pour générer des souches virales à haut rendement de production (Hoffman, 2002). Moins il y a de plasmides nécessaires, plus l'étape de transfection sera efficace. Cette technique permet de combiner les antigènes HA et NA d'une souche influenza donnée avec le matériel viral d'une autre souche se répliquant à hauts titres dans des cellules. Elle se révèle donc utile pour la

sélection de réasortants, l'atténuation de la virulence de certaines souches extrêmement pathogènes (H7N7), ou encore la constitution de banques de virus via la culture de cellules (Palker, 2004; Nicolson, 2005).

Cependant, la culture de cellules s'avère d'intérêt beaucoup plus large car elle permet également la production directe de virus à l'échelle industrielle pour la production de vaccins, que les cellules soient d'origines mammifère ou aviaire.

2.2 Possibilités qu'offre la culture de cellules

En effet, la culture de cellules de mammifères est déjà utilisée depuis plus de 30 ans par l'industrie biopharmaceutique aussi bien pour la production de protéines recombinantes à des fins d'applications thérapeutiques ou de vaccination (Aunins, 2000). Elle permet la production du produit d'intérêt dans un environnement clos et parfaitement contrôlé en quelques semaines seulement, contre plusieurs mois pour la méthode conventionnelle des œufs. Une fois la méthode validée, le procédé peut être relativement facilement transposé à l'échelle industrielle sur des bioréacteurs de plus de 1000L. Cette méthode permet notamment de s'affranchir du risque de contamination microbiologique ainsi que des risques d'allergie rencontrés avec les œufs. Il est également mis de l'avant que les virus produits dans des cellules de mammifères conserveraient mieux leurs caractéristiques antigéniques et induiraient donc une meilleure réponse immunitaire croisée (Bardiya, 2005; Zhirnov, 2009).

La culture de cellules comme alternative de production apporterait donc une plus grande réactivité face aux risques de pandémies en permettant de constituer un vaccin ciblant une souche circulante en quelques semaines seulement. Depuis un peu plus de 10 ans, les compagnies s'engagent dans le développement de lignées cellulaires de substitution aux œufs. Deux facteurs sont alors à prendre en compte : la lignée cellulaire et le type de vaccin à produire.

2.2.1 La lignée cellulaire

Pour être d'intérêt pour la production industrielle, une lignée cellulaire doit posséder plusieurs caractéristiques. Tout d'abord, elle doit être caractérisée et approuvée pour la production de produits à visée thérapeutique. Elle doit coupler une croissance rapide à de hautes densités (temps de doublement de 20-30h), et maintenir une bonne viabilité. La culture doit se faire idéalement dans un milieu chimiquement défini afin de faciliter les étapes de purification, et sans composés d'origine animale pour éviter les risques de contamination (exemple : Prion). La culture doit également être facilement transposable à l'échelle industrielle (Bioréacteur $\geq 1000\text{L}$) en favorisant une lignée qui se cultive en suspension et en évitant les changements de milieux non nécessaires. Pour certains procédés détaillés plus loin, un changement de milieu avant infection est requis, alors que d'autres vont permettre d'infecter les cellules directement dans le milieu de culture. La lignée doit également permettre d'amplifier efficacement la souche virale d'intérêt ($>2500 \text{ HA/mL}$, $>10^8 \text{ TCID}_{50}/\text{mL}$) (Unités définies aux sections 3.6.3 et 3.6.4).

L'optimisation de la propagation virale dans la culture de cellules vise tout d'abord à s'assurer de la qualité de la souche virale (infectivité élevée) et de sa stabilité dans le temps. L'optimisation des paramètres d'infection se fait en déterminant la nécessité ou non d'ajout de trypsine dans le milieu d'infection, la multiplicité d'infection optimale ($\text{moi} = \text{quantité de virus à ajouter} / \text{cellule}$), la densité cellulaire appropriée à l'infection, l'effet du milieu et le temps de récolte afin d'obtenir les meilleurs titres viraux. Le procédé de production doit enfin être validé à petite et grande échelles.

2.2.2 Le type de vaccin

Différentes approches sont en voie de développement en fonction du produit final attendu: la production de virus inactivés ou vivants atténués.

2.2.2.1 Virus inactivés

Cette méthode classique consiste à infecter des cellules avec une souche virale infectieuse et à la laisser se répliquer. Le surnageant contenant les particules virales est ensuite récolté et les particules purifiées, avant d'être finalement inactivées suivant les mêmes procédés décrits pour les œufs. Le matériel de départ est donc du virus vivant infectieux ayant la capacité de se répliquer. Cette première approche reprend les connaissances acquises pour la production d'autres virus, complétée par un développement et une optimisation des conditions de culture et d'infection propre à chaque lignée cellulaire et souche virale.

2.2.2.2 Virus vivants atténués

Par de nombreux passages en laboratoire, 3 types de réassortants ont été sélectionnés pour leur perte de virulence: sensible à la température (Ts), à l'hôte (hr) ou adapté à basse température (« cold adapted » = Ca). Pour des raisons d'instabilité génique et de retour potentiel de virulence, seule la souche Ca fut sélectionnée pour des études plus approfondies (Wareing, 2001). Cette souche atténuée, incapable de créer une maladie chez l'humain, peut donc être co-cultivée avec une souche sélectionnée pour le vaccin saisonnier afin d'obtenir un réassortant couplant les gènes HA et NA de cette souche d'intérêt aux autres gènes de la souche Ca. Un vaccin de ce type a d'ailleurs été accepté et testé efficacement sur des millions de personnes (Belshe, 2004; Kendal, 1997; Pfleiderer, 2002).

2.3 Les lignées cellulaires utilisées comme système de production

Au cours des 5 dernières années, les principales lignées cellulaires en cours d'études ou utilisées pour la production de vaccins sont d'un côté les lignées continues conventionnelles MDCK et Vero, cultivées en adhérence, et de l'autre, les cellules PER.C6 cultivées en suspension. Ces trois lignées présentent des productions virales à titres équivalents et les premiers vaccins issus de ces cultures sont au stade des études cliniques ou déjà commercialisés. La lignée MDCK, la plus étudiée, est devenue la lignée principale de référence dans le domaine. De nouvelles lignées

cellulaires (PBS-1, AGE1.CR, EB14/EB66...) sont également présentées dans la littérature comme candidates potentielles pour la production du virus influenza. Ces cellules transformées sont généralement adaptées à la culture en suspension en milieu sans sérum et des titres viraux acceptables ont été obtenus avec la plupart d'entre elles.

Suite à l'effet médiatique de la grippe pandémique A/H1N1, la dernière année a été l'une des plus fructueuses au niveau des publications relatives aux avancées scientifiques portant sur la production d'influenza. De nombreuses publications font ainsi état des titres obtenus dans de nouvelles lignées cellulaires, de l'optimisation des procédés de culture et d'infection de lignées connues, de schémas métaboliques ou encore de nouvelles méthodes de quantification. Le Tableau 2.1 regroupe les principaux résultats publiés au cours des dernières années.

2.3.1 Les cellules adhérentes

La culture de cellules adhérentes est difficilement transposable à l'échelle industrielle car elle nécessite une augmentation considérable de la surface de culture et des installations qui se traduisent par des coûts élevés. Elles sont également traditionnellement cultivées dans du milieu contenant du sérum, ce qui pose des problèmes de risque de contamination. Ces deux points sont les désavantages principaux de ce type de lignées. Actuellement de gros progrès ont été faits sur les changements d'échelles pour les cellules adhérentes (flacons roulants, réacteurs de type spinner, lit fixe ou fluidisé, microbilles en bioréacteur, bioréacteur « wave-bag »), ainsi que dans la recherche de milieux alternatifs de croissance sans sérum. La trypsine joue un rôle déterminant dans l'activation des particules virales en clivant l'hémagglutinine HA₀ en deux sous-unités HA₁ et HA₂ actives (Klenk, 1975). Sa concentration reste cependant un paramètre critique car une activité enzymatique trop élevée peut induire le détachement des cellules de leur support.

Tableau 2.1. Principales lignées en cours d'étude pour la production d'influenza.

Lignée	Échelle	Densité à l'infection (10 ⁶ cells/mL)	Présence de sérum	Temp (°C)	Trypsine (µg/mL)	Souche virale	Moi (IVP/cell)	Titre HA (HA/mL)	Infectivité TCID ₅₀ /mL	Année	Références
MDCK en adh	Plaques 6-puits	2	AS	37	4	A/Netherlands/18/94 (H3N2)	0.0001	512	2.10 ⁷	1998	Rimmelzwaan
MDCK en adh	Plaques 96-puits	100% confluence	SS	37	5	A/PR/8/34 (H1N1) A/Hong Kong/2/68 (H3N2)	0.001- 1	-	-	1999	Voeten
MDCK en adh	Réacteur de 5-L	100% confluence	AS	37	12.5	A/Equi2 (H3N8) Newmarket 1/93	0.0025	2500	-	2004	Genzel
MDCK en adh	Réacteur de 5-L	100% confluence	AS et SS	37	12.5	A/PR/8/34 A/Equi2 (H3N8) Newmarket 1/93	0.05	4000(AS) 2000(SS)	-	2006	Genzel
MDCK en adh	Réacteur de 2-L	100% confluence	AS et SS	37	1mg/3-10.10 ⁷ cells	A/Equi2 (H3N8) Newmarket 1/93	0.04-0.05	4000(AS) 2000(SS)	5.10 ⁷	2006	Genzel
MDCK en adh	Réacteur de 2-L	100% confluence	SS	37	2.10 ⁻⁶ U/cell	A/PR/8/34 (RKI) A/PR/8/34 (NIBSC) (H1N1)	0.025	1000(AS) 8000(SS)	1,3.10 ⁵ 1,0.10 ⁹	2009	Schulze-Horsel
MDCK en adh	Flacons	100% confluence	AS et SS	33	500mU/mL	Ca A/Sydney/05/97 (H3N2)	0.001	-	1,6.10 ⁶ (AS) 1,3.10 ⁴ (SS)	2009	Liu

en adh = en adhérence ; AS= avec serum / SS= sans sérum ; Ca = « cold adapted » ; IVP = particules virales infectieuses

100% confluence = (1.2-1.6) x10⁵ cells/cm²

Tableau 2.1. (Suite) Principales lignées en cours d'étude pour la production d'influenza.

Lignée	Échelle	Densité à l'infection (10 ⁶ cells/mL)	Présence de sérum	Temp (°C)	Trypsine (µg/mL)	Souche virale	Moi (IVP/cell)	Titre HA (HA/mL)	Infectivité TCID ₅₀ /mL	Année	Références
MDCK en suspension	Flacons de 125 mL	10	SS	33	-	B/Victoria/504/2000	1-2	5100 (adh) 41 000 (susp)	7,9.10 ⁶ (adh) 7,4.10 ⁷ (susp)	2009	Chu
Vero en adh	Réacteur de 15-L	5	SS	32	20mU/mL	A/PR/8/34 (H1N1)	0.01	2560	-	1998	Kistner
Vero en adh	Plaques 6-puits	-	AS	30	8.33	A/Leningrad/134/57 (H2N2)	0.01	-	9.10 ⁹	2004	Youil
Vero en adh	Réacteur de 3-L 100-L	5	SS	32	20mU/mL	A/Vietnam/1203/2004 (H5N1)	0.001	5120-10240	4 - 1.10 ⁹	2007	Kistner
Vero en adh	Réacteur de 3-L 6000-L	5	SS	32	20mU/m	A/Vietnam/1203/2004 (H5N1) (H5N1)	0.001	-	2,5.10 ⁸	2008	Howard
Vero en adh	Flacons	100% confluence	AS et SS	33	500mU/mL	Ca A/Sydney/05/97 (H3N2)	0.001	-	1.10 ⁷ (AS) 3,1.10 ⁶ (SS)	2009	Liu

en adh = en adhérence ; AS= avec serum / SS= sans sérum ; Ca = « cold adapted » ; IVP = particules virales infectieuses

100% confluence = (1.2-1.6) x10⁵ cells/cm²

Tableau 2.1. (Suite) Principales lignées en cours d'étude pour la production d'influenza.

Lignée	Échelle	Densité à l'infection (10 ⁶ cells/mL)	Présence de sérum	Temp (°C)	Trypsine (µg/mL)	Souche virale	Moi (IVP/cell)	Titre HA (HA/mL)	Infectivité TCID ₅₀ /mL	Année	Références
PER.C6 en suspension	Réacteur de 3-L	3	SS	35	5	A/Sydney/5/97 (H3N2)	0.0001	2100	10 ¹⁰	2001	Pau
PBS-1 CEK en adh (avian)	Plaques 48-puits	80% confluence	AS	37	2	A/New Caledonia/20/1999 (H1N1)	1	320	3,1.10 ⁷	2008	Smith
AGE1.CR (avian) en suspension	Réacteur de 5-L	3	SS	37	1.10 ⁻⁶ U/cell	A/PR/8/34 (H1N1)	0.0025	10 000	1.10 ⁸	2009	Lohr

en adh = en adhérence ; AS= avec sérum / SS= sans sérum ; Ca = « cold adapted » ; IVP = particules virales infectieuses

100% confluence = (1.2-1.6) x10⁵ cells/cm²

2.3.1.1 Les cellules MDCK

Les cellules MDCK sont des cellules adhérentes polarisées et souvent utilisées comme modèle dans des recherches fondamentales pour étudier les mécanismes de transport et d'adressage de protéines dans les tissus (Cordat, 2006; Simmons, 1982). Différentes lignées MDCK sont disponibles auprès de diverses collections (American Type Culture Collection (ATCC), European Collection of Cell Culture (ECACCs)), mais de nombreuses lignées sont présentes dans des laboratoires de recherche sans historique connu. Les origines très diverses des cellules expliquent en partie les résultats souvent très différents rencontrés dans la littérature. Beaucoup de références relatives à la production d'influenza dans les cellules MDCK sont disponibles (Tableau 2.1); cependant les résultats présentés ne sont pas forcément comparables entre eux car ils dépendent des conditions de culture et d'infection, du milieu utilisé ou encore de l'échelle de production.

Le procédé typique de culture de cellules MDCK consiste à cultiver ces cellules en monocouche dans du milieu contenant du sérum, entre 32 et 37°C. Avant infection, une étape de lavage précède le changement de milieu, afin d'infecter les cellules dans des conditions sans sérum et avec trypsine. Durant la phase d'infection, des titres allant de 2500 à 10 000 HA/mL et supérieurs à 10^7 IVP/mL peuvent être obtenus.

Les cellules MDCK offrent l'avantage de cellules résistantes qui s'adaptent facilement à d'autres milieux de cultures, dans une large gamme de pH. Elles ne sont pas trop sensibles à l'aération et à l'agitation, et se remettent à pousser rapidement après décongélation. L'utilisation de milieux sans sérum avec les cellules MDCK n'était initialement pas envisageable car l'absence de sérum rendait les cellules tumorigènes (Schwartz, 2006). Cependant un procédé complet de production sans sérum avec infection directe dans le milieu de culture a été publié (Genzel, 2006).

Les compagnies actuelles qui considèrent les cellules MDCK pour la production de vaccins sont : GlaxoSmithKline (Middlesex, UK), MedImmune Vaccines et Solvay Pharmaceuticals Inc (GA, USA). MedImmune Vaccines et Solvay Pharmaceuticals Inc cultivent la lignée MDCK CCL-34 (ATCC) en milieu sans serum, en bioréacteurs de 50 à 2500 L et atteignent des productions de l'ordre de $7-16 \times 10^7$ IVP/mL (MedImmune). Le vaccin qui en résulte (FluMist), est administré par voie intranasale. Afin de s'assurer de la sécurité de ces lignées cellulaires pour les vaccins produits, ces fabricants ont réalisé les études requises et ont démontré que les cellules MDCK

étaient acceptables pour la production de vaccins humains (Gregersen, 2008). Les résultats d'études cliniques de phase I et II ont été décrits par Groth et al. (2009).

2.3.1.2 Les cellules Vero

Les cellules Vero ont une longue histoire dans la production de vaccin (polio et rage) (Aunins, 2000; Trabelsi, 2006; Rourou, 2007) et ont été recommandées par l'OMS pour la production du vaccin influenza. La sécurité de la lignée de la banque principale a été démontrée et validée depuis de nombreuses années (Kistner, 1998). Deux compagnies : Baxter Vaccines (Vienne, Autriche) et AVIR Green Hills Biotechnology (Vienne, Autriche), ont établi leurs procédés de production de vaccin contre l'influenza avec ces cellules.

Ces cellules se cultivent généralement à 32°C en multicouches sur des micro-soutports et sont sensibles à l'effet de cisaillement et aux variations de pH. Les cellules Vero sont réputées pour ne pas produire d'interférons (IFN), qui sont connus pour jouer un rôle important dans le phénomène d'apoptose et dans la réponse immunitaire des cellules suite à une infection. Les modèles de glycosylation des cellules Vero sont également différentes de ceux obtenus avec les cellules MDCK (Schwarzer, 2009) et l'impact sur l'immunogénicité nécessite un examen plus approfondi. Howard et al (2008) décrivent la production en bioréacteur de 30-, 100- et 6000-L en niveau 3 de biosécurité. Avec une production moyenne de 340-580 doses/L, un bioréacteur de 6000-L permet de fournir plus de 3 millions de doses. La sécurité et l'immunogénicité d'un vaccin A/H5N1 inactivé issu de ces cellules est présenté par Ehrlich et al. (2009).

Bien que les virus influenza semblent se répliquer aussi bien dans les deux lignées cellulaires, les cellules MDCK et Vero sont toujours en concurrence dans la littérature afin de déterminer la meilleure lignée comme alternative de production de vaccin contre influenza et pour la sélection de recombinants. Les cellules MDCK semblent cependant montrer une plus grande infectivité que les cellules Vero vis-à-vis des souches A et B (Youil, 2004).

2.3.2 Les cellules en suspension

La culture de cellules en suspension présente de nombreux avantages. Elle permet d'atteindre de hautes densités cellulaires, de s'affranchir de milieux contenant du sérum (souvent nécessaires pour la fixation des cellules adhérentes), et le changement d'échelle des procédés en est considérablement facilité. Les lignées cellulaires PER.C6® et MDCK 33016-PF se cultivent en suspension et sont actuellement utilisées pour la production de vaccins contre influenza. Les cellules PER.C6 ont été modifiées par transformation spécialement pour la production de vaccin, alors que la lignée MDCK 33016-PF de Novartis a été adaptée de la lignée MDCK CCL-34 adhérente afin d'être cultivée en milieu sans sérum et sans protéine.

2.3.2.1 Les cellules PER.C6

La lignée cellulaire PER.C6 est initialement dérivée de cellules de rétine humaines immortalisées par transfection d'un adénovirus (Fallaux, 1998). Ces cellules, cultivées en suspension dans du milieu sans sérum, doublent toutes les 35h. Leur utilisation potentielle pour la production d'influenza a été montrée par infection d'un bioréacteur de 3-L, par Pau et al (2001). Les cellules peuvent se cultiver à hautes densités (10^7 cells/mL). Des titres infectieux de 10^{10} TCID₅₀/mL ont été obtenus pour la souche A/Sydney/5/97, ce qui semble supérieur aux titres obtenus avec les cellules MDCK ou Vero. Le procédé a été breveté en 2007 par Crucell (Crucell, 2007). Sanofi Pasteur a acquis la licence et réalisé les premiers résultats d'études cliniques de phase I qui ont été publiés en 2009 (Cox, 2009). Les cellules PER.C6 peuvent être utilisées à la fois en adhérence ou en suspension pour la génération de virus par génétique inverse (Koudstaal, 2009), et leur temps de génération a pu être considérablement réduit à 16h au cours de l'adaptation, en augmentant le nombre de passages (Berdichevsky, 2008).

2.3.2.2 Les cellules MDCK 33016-PF

Les cellules MDCK 33016-PF sont actuellement brevetées et utilisées pour la production de vaccins par Novartis. Elles sont cultivées à grande échelle (> 100L) et ont été validées au cours de multiples essais cliniques et parfaitement caractérisées (Gregersen, 2008; Groth, 2009). Le vaccin produit avec cette lignée cellulaire est le premier TIV saisonnier dérivé de culture de cellules (Optaflu®) à être distribué sur le marché (Doroshenko, 2009). En tant que lignée brevetée, peu d'études ont été réalisées par des laboratoires académiques afin de pouvoir comparer la physiologie, les paramètres de culture et de production du virus de cette lignée avec la lignée MDCK adhérente.

Une autre lignée MDCK a été transformée pour être adaptée à la suspension dans du milieu chimiquement défini pour des fins de recherche (Chu, 2009). Avec un temps de doublement de 31-34h (contre 22-24h pour la lignée adhérente), la croissance cellulaire de cette lignée doit encore être optimisée. L'étude comparative des profils de glycosylation de HA de cette lignée avec les cellules MDCK adhérentes de référence, de même que des résultats de production à petite et plus grande échelle, sont encore nécessaires afin de valider cette nouvelle souche comme support potentiel de production.

2.3.3 Les autres lignées candidates

Au cours des dernières années, d'autres lignées cellulaires pour la production d'influenza sont apparues sur le marché comme support alternatif de production. Les recherches sur ces lignées sont en cours.

2.3.3.1.1 AGE1.CR®

La compagnie ProBioGen AG (Allemagne) en coopération avec IDT Biologika GMBH (Allemagne) ont développé deux lignées cellulaires AGE1.CR et AGE1.CR.pIX, dérivées de cellules aviaires immortalisées par adénovirus (Jordan, 2009). Ces deux lignées cellulaires se cultivent en suspension en milieu sans sérum et supportent la réplication de différents virus influenza à des titres équivalents à ceux obtenus avec MDCK ou Vero (Lohr, 2009). La

production en bioréacteur de 1-L a permis de développer un procédé beaucoup plus simple et rapide qu'avec les cellules MDCK traditionnelles : le titre viral maximum est obtenu en 96h au lieu de 144h avec MDCK, la densité cellulaire maximale est de 9×10^6 cells/mL avec un temps de génération de 22-23h. Cette lignée offre donc des résultats similaires à ceux obtenus avec PER.C6. Cependant les résultats des profils de glycosylation montrent de claires différences avec les cellules MDCK ou Vero et sont donc à approfondir afin de valider le profil d'immunogénicité.

2.3.3.1.2 EB14®/EB66®

Ces deux lignées cellulaires, cultivées en suspension dans du milieu sans sérum, sont dérivées de cellules souches embryonnaires de canard et semblent être une autre option d'intérêt pour le développement de procédés alternatifs de production de vaccins. En effet, ces cellules se cultivent à très haute densité en bioréacteur de 3-L et en mode fed-batch (13×10^6 cell/mL) et, dépendamment de la souche virale utilisée, des titres infectieux de 10^7 à 10^9 TCD₅₀/mL ont été obtenus (Vivalis, 2006). La compagnie Vivalis a notamment accordé des licences de recherches et commerciales EB66® aux groupes pharmaceutiques GSK et Sanofi Pasteur pour la production de vaccins antigrippaux saisonniers et pandémiques.

2.3.3.1.3 PBS-1

Les cellules PBS-1 sont des cellules embryonnaires de poulet immortalisées, décrites pour la première fois en 1987 (Ogura, 1987). Ces cellules se cultivent en adhérence. L'étude d'infection de ces cellules par influenza n'a été réalisée qu'en plaque 48 puits et indique un titre HA maximum de 3000 HA/mL (Smith, 2008).

2.3.3.1.4 SJPL

Les cellules SJPL (Saint Jude Porcine Lung) sont issues de cellules épithéliales de poumons de porc, cultivées en adhérence. Une étude datant de 2001 compare cette lignée directement avec les cellules MDCK et indique des résultats supérieurs à ceux de la lignée de référence (Seo, 2001). De manière intéressante, l'apoptose ne serait pas induite dans ces cellules.

2.4 Les cellules HEK-293 offrent une alternative d'intérêt

Pour le développement de nouveaux procédés de fabrication de vaccin, les propriétés de la lignée cellulaire ainsi que les titres maximums produits sont des points importants. Il est difficile de déterminer laquelle des lignées cellulaires présentées auparavant est la meilleure candidate au vu des nombreux facteurs intervenants à prendre en compte (équipements, culture en suspension ou en adhérence, milieux avec ou sans sérum, étapes de purification, caractérisation du produit fini, études cliniques). Il semble d'intérêt pour le moment de tester un maximum de lignées candidates et de mettre au point des procédés de culture afin de pouvoir envisager la production de vaccins antigrippaux saisonniers et pandémiques.

Les cellules HEK-293 sont une lignée approuvée et validée depuis de nombreuses années comme une plate-forme de production à grande échelle efficace pour la production à la fois de protéines recombinantes et de vecteurs viraux par transfection (Durocher, 2002; Pham, 2005). Cette lignée cellulaire est extrêmement documentée et offre l'avantage d'être cultivée en suspension à haute densité (10^7 cell/mL) et dans du milieu sans sérum (Côté, 1998). De récentes études ont permis de mettre en évidence que les risques de tumorigénicité de ces cellules pouvaient être évités en portant attention au nombre de passages des cellules (Shen, 2008). Plusieurs vecteurs viraux produits dans les cellules HEK-293 sont actuellement en études cliniques de phase II et III, et un premier produit, Xigris®, contenant une protéine recombinante humaine, a été approuvée par la FDA en 2001 et est depuis commercialisé par la compagnie Eli Lilly. (URL : Xigris)

Les cellules humaines sont supposées mieux respecter les profils de glycosylation des virus humains afin d'assurer leur réplication efficace. Au début de cette étude, les premiers résultats effectués sur les cellules PER.C6 étaient prometteurs mais relativement succins et dataient de 2001. Fort de ces résultats obtenus sur une lignée humaine, ce projet d'étude a été conduit afin de montrer que les cellules HEK-293 étaient un système alternatif d'intérêt pour la production de particules influenza, offrant l'avantage d'une lignée reconnue par l'industrie pharmaceutique et se cultivant en suspension en milieu sans sérum.

CHAPITRE 3 MATÉRIEL ET METHODES

3.1 Lignées cellulaires

3.1.1 Cellules HEK-293

Les cellules HEK-293 (Human Embryonic Kidney) sont dérivées d'une lignée cellulaire adhérente (ATCC : CRL 1573), qui a été adaptée à la suspension dans du milieu sans sérum (Côté, 1998). La lignée HEK-293 3F6 utilisée pour cette étude a été générée à partir d'un tube de la Banque maitresse (MCB) et certifiée suivant les Bonnes Pratiques de Laboratoires (Good Manufacturing Practices).

Ces cellules, référées comme cellules HEK-293, sont cultivées en suspension, dans du milieu SFM4TransFx-293 (HyQ), sans sérum et sans composé d'origine animale (HyClone, Waltham, MA, USA). Leur temps de génération est d'environ 22h. En batch dans le milieu HyQ, leur croissance est supportée jusqu'à des densités supérieures à 10^7 cell/mL.

3.1.2 Cellules MDCK

Les cellules MDCK (Madin Darbin Canine Kidney) proviennent de la banque d'ATCC (CCL-34). Ces cellules sont cultivées en adhérence dans du milieu EMEM (Eagle's Minimum Essential Medium) (ATCC : 30-2003) complémenté de sérum fœtal bovin (FBS). Leur temps de génération est d'environ 24h.

3.2 Choix du milieu de culture des cellules HEK-293

3.2.1 Etudes préliminaires

Avant le début de cette étude, les cellules HEK-293 étaient cultivées en suspension dans du milieu LC-SFM (Gibco, Grand Island, NY) supplémenté par 0.1% Pluronic F-68, 0.1% Albumine de sérum bovin (BSA) (Serologicals Proteins Inc., Kankakee, Illinois) et 0.1% lipides (Lipid Mixture (1000x), L5146, Sigma).

Dans le but de s'affranchir des composés d'origine animale, des études préliminaires ont été réalisées sur les cellules HEK-293. Dans un premier temps, la BSA a été remplacée par une albumine recombinante, mais ces résultats ne furent pas concluants. Des séries de culture en cuvée (batch) ont alors été réalisées dans différents milieux commerciaux sans sérum, Pro 293sCDM (Lonza), CDM 4HEK293 (HyClone) et HyQ SFM4TransFx-293 (HyClone) et dans un milieu de composition « maison » réalisé par le Dr. Shen (IRB-CNRC, QC, Canada).

Les résultats ont mis en évidence que le milieu HyQ TransFX était un bon milieu de remplacement qui supportait à la fois une croissance cellulaire 3 à 5 fois supérieure à celle observée dans le milieu de contrôle LC-SFM, permettait d'atteindre des densités de l'ordre de 10^7 cell/mL (Fig.3.1), et maintenait une production efficace, similaire à celle obtenue dans le LC-SFM, de l'ordre de 10^9 particules/mL lorsque les cellules étaient infectées par de l'adénovirus recombinant (résultats non montrés).

3.2.2 Préparation du milieu HyQ TransFx

Le milieu HyQ est acheté sous forme d'une poudre, dissoute dans de l'eau milliQ, et supplémenté de 2g/L de bicarbonate de sodium, 1g/L de Pluronic F-68 et 4mM de L-Glutamine, avant d'être filtré sur filtre de 0.2 μ m (Corning, CA, USA). Il est conservé (à 4°C) jusqu'à 2-3 mois en solution et plusieurs années sous forme de poudre.

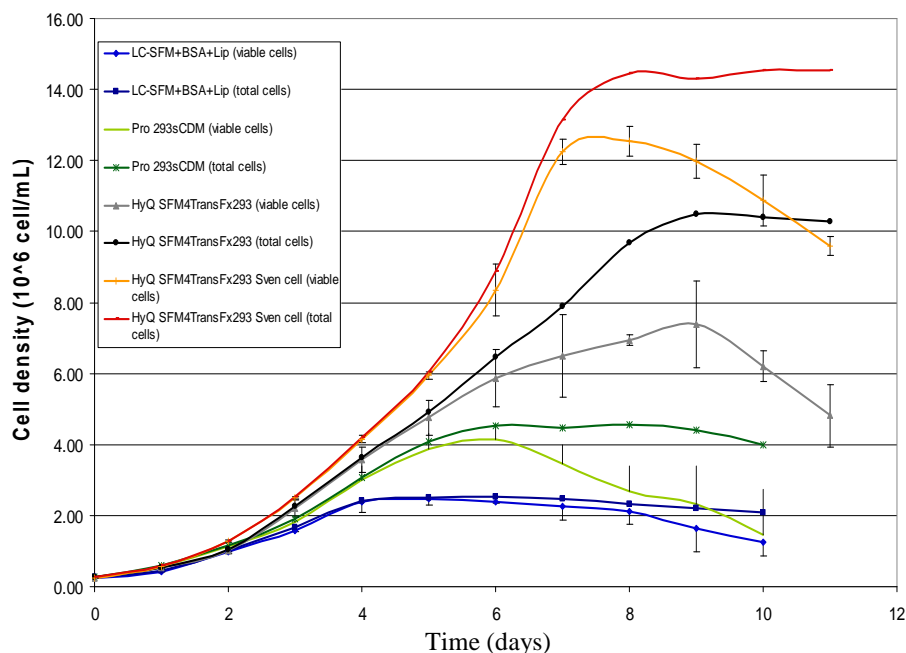


Figure 3.1: Croissance cellulaire des HEK-293 dans différents milieux de culture. (Courbes moyennes de 4 batch successives). Taux de croissance moyens : LC SFM = 0.028 h^{-1} , Pro293 = 0.031 h^{-1} , HyQTransFX = 0.030 h^{-1} , HyQTransFX = 0.032 h^{-1} . (Note : croissance instable des cellules HEK-293 dans le milieu CDM 4HEK293, donc non-représentée).

3.3 Souches virales influenza

Les souches virales influenza proviennent toutes du Global Bioresource Center d'ATCC : A/PR/8/34 (H1N1) (VR-1469), A/WS/33 (H1N1) (VR-1520), A/Aichi/2/68 (H3N2) (VR-1680), A/Hong Kong/8/68 (H3N2) (VR-1679) et B/Lee/40 (VR-1535) et étaient toutes adaptées sur MDCK ou à la culture sur tissus. Ces souches virales infectieuses sont conservées à -80°C et utilisées en niveau 2 de biosécurité.

La première souche A/PR/8/34 étudiée fut amplifiée initialement dans les cellules MDCK afin de constituer un stock viral, et analyser le déroulement de l'infection sur une lignée de référence. Les études suivantes ont été faites en parallèle sur les cellules HEK-293 et MDCK. Ces premières infections sur HEK-293 par A/PR/8/34 étant concluantes, les autres souches virales ont directement été amplifiées en parallèle dans les cellules HEK-293 et MDCK.

3.4 Méthodes de culture et d'infection

3.4.1 Maintenance des cellules HEK-293

Les cellules HEK-293 sont cultivées en suspension, à 37°C et 5% CO₂, dans du milieu HyQTransFx (HyClone, Waltham, MA, USA). Elles sont re-ensemencées 2 à 3 fois par semaine dans du milieu frais à des densités comprises entre 0.1 et 0.2 x 10⁶ cells/mL, en erlenmeyers de 125 mL ou 250 mL (volume de culture : 20 et 90 mL, respectivement).

3.4.2 Maintenance des cellules MDCK

Les cellules MDCK sont cultivées en adhérence (flasques T-75) dans du milieu EMEM (ATCC : 30-2003) supplémenté de 10% de sérum fœtal bovin (FBS) inactivé par la chaleur (30 min à 56 °C). Ces cellules sont re-ensemencées 2 à 3 fois par semaine dans du milieu frais, à des densités allant de 0.05 à 0.15x10⁶ cells/mL (volume de culture : 10mL), et incubées à 37°C et 5% CO₂.

Trypsinisation des cellules : Après 2 lavages au PBS pour retirer toute trace de sérum, les cellules sont décollées sous action de 0.25% Trypsine-EDTA (Sigma, T4049) à raison de 2-3 mL de trypsine par flasque T-75 (7-15 min). Une fois les cellules décollées, l'action de la trypsine est arrêtée par ajout de 7-8mL de milieu de culture (EMEM + 10% FBS), et les cellules sont comptées et repiquées à la densité voulue.

3.4.3 Infection des cellules HEK-293

Les études d'infection à petite échelle ont été réalisées dans des erlenmeyers de 125 mL à 1 L, dans un laboratoire de niveau 2. Avant infection, les cellules HEK-293 en phase exponentielle sont culottées par centrifugation (250 g x 5 min) et re-suspendues à 1x10⁶ cells/mL dans du

milieu de croissance virale (Virus Growth Medium = VGM) composé de milieu HyQ TransFx supplémenté avec 1 à 5 µg/mL de Trypsine-TPCK (USB Corporation, Cleveland, OH, USA). Le jour même, les cellules sont infectées par addition de la souche virale influenza à une multiplicité d'infection (moi) variant de 1 à 10^{-5} Particules Virales Infectieuses (IVP) par cellule. La culture infectée est alors placée en incubateur à 35°C et 5% CO₂ pendant 4 à 5 jours. Le suivi de l'infection se fait par comptages et échantillonnages quotidiens de la culture. Les échantillons sont centrifugés (250 g x 5 min) afin de ne conserver que le(s) surnageant(s) de culture qui sera(ont) congelé(s) à -80°C en attendant les analyses complémentaires.

Lors de la récolte (toujours en niveau 2 de biosécurité), la totalité du milieu de culture est centrifugé une première fois à basse vitesse (250 g x 5 min) puis une seconde fois plus rapidement (1500 g x 10 min) afin de culotter les cellules et autres débris cellulaires et de récupérer le surnageant contenant les particules virales produites. Ce surnageant sera aliquoté en petits volumes et conservé à -80°C en attendant l'exécution d'analyses complémentaires.

3.4.4 Infection des cellules MDCK

Les cellules MDCK sont re-ensemencées la veille de l'infection, dans du milieu EMEM + 10% FBS, à moitié de la densité totale voulue le jour de l'infection, afin de leur laisser de temps d'adhérer au support. Le jour de l'infection, les cellules vont être rincées par deux lavages au PBS, avant l'ajout du milieu d'infection composé de milieu de culture (EMEM +10% FBS) supplémenté de 1% d'HEPES et de 1µg/mL de Trypsine-TPCK. Les cellules sont ensuite directement infectées par addition du virus à la moi choisie et placées en incubateur à 35°C et 5% CO₂. Les échantillonnages et la récolte sont réalisés de la même manière que précédemment (cf. 3.4.3).

3.5 Méthode de purification

Le milieu de culture est centrifugé une première fois à basse vitesse (3500 rpm x 7 min) afin d'éliminer les cellules et gros débris cellulaires et de récupérer le surnageant.

Concentration 100X : le surnageant est ensuite centrifugé à haute vitesse (ultra-centrifugation) sur coussin de sucrose afin de concentrer le virus. Les principales étapes consistent à remplir les bouteilles de centrifugation avec 220 mL de surnageant (ou à compléter si nécessaire au volume indiqué avec du tampon TrisHCl à 20 mM), puis à ajouter 20 mL de solution de sucrose à 20 % dans chaque bouteille, et finalement à ajuster le poids des bouteilles (deux à deux) par ajout de tampon TrisHCl. La centrifugation se fait ensuite à 15 000 rpm pendant 3h à 4°C (Ultracentrifugeuse Discovery SE 100 et rotor A621, Sovall). Après centrifugation, le surnageant est éliminé et le culot est doucement re-suspendu dans 2.2 mL (volume de surnageant réduit 100X) de Tris HCl (20mM) + 5% sucrose. Afin de laisser les culots se re-solubiliser complètement, les bouteilles sont conservées à 4 °C toute une nuit.

Digestion à la benzonase : le lendemain, les culots sont rassemblés dans un tube à essai, et digérés à la benzonase par ajout de 100U/mL pendant 1h à 37°C. Après digestion, l'échantillon est filtré sur une membrane HT Tuffryn® de 0.45µm (Sterile Acrodisc® Syringe Filter, Pall Life Sciences, FR).

Purification au Iodixanol : l'échantillon filtré est ensuite ajouté à une solution de départ à 18% d'Iodixanol pour la seconde étape d'ultracentrifugation, à raison de 3.51 mL d'échantillon dans 13 mL d'Iodixanol à 22.86%. 13 mL de cette préparation sont déposés dans chaque tube d'ultracentrifugation et leur poids est ajusté deux à deux, avant de sceller les tubes. L'ultracentrifugation se fait à 64 000 rpm pendant 6h à 4°C (Ultracentrifugeuse Discovery SE 100 et rotor 65V13, Sovall). Après centrifugation, 13 fractions de 1 mL chacune sont récoltées, à des gradients de iodixanol différents, et aliquotées pour être conservées à -80 °C en attendant la suite des analyses.

3.6 Méthodes de quantification et de détection

3.6.1 Test de détection Sia2-3Gal et Sia2-6Gal

La présence des récepteurs sialiques Sia2-3Gal et Sia2-6Gal nécessaires à la fixation du virus influenza sur la cellule est déterminée en utilisant un kit commercial (DIG Glycan Differentiation kit, Roche), suivant le protocole de Kogure, 2006. Ce kit contient des lectines-marquées DIG, reconnues par un anticorps fluorescent anti-DIG (Roche, #11207741910). La détection se fait ensuite par cytométrie de flux (FACS). Les deux lectines sont : *Sambucus nigra agglutinin* (SNA) qui se fixe spécifiquement sur les résidus Sia2-6Gal, et *Maackia amurensis agglutinin* (MAA) qui se fixe sur Sia2-3Gal. Les cellules MDCK et les CHO servent respectivement de contrôles positif et négatif.

Préparation des échantillons : Les cellules (HEK-293, CHO ou MDCK*) sont tout d'abord ajustées à la densité voulue (0.25×10^6 cellules totales dans 0.5 mL de PBS), puis incubées avec 2 μ L de lectine SNA ou 10 μ L de lectine MAA dans 0.5% de BSA, sur de la glace pendant 30 min. Les cellules sont ensuite centrifugées (200 g x 5 min) pour éliminer le surnageant, délicatement re-suspendues et incubées avec 10 μ L ($1/50^e$) d'anticorps conjugués au DIG, dans 0.5% de BSA, sur de la glace pendant 30 min. Après cette deuxième incubation, les cellules sont de nouveau centrifugées (200 g x 5 min) pour éliminer le surnageant et les cellules sont délicatement resuspendues dans 0.5 mL de PBS + 0.5% BSA. Les échantillons sont ensuite filtrés et conservés à 4°C (ou sur glace) avant les analyses au FACS.

3.6.2 Détection par immunofluorescence (Kit IMAGEN™)

La détection du virus influenza sur des cellules infectées se fait grâce au kit IMAGEN™ Influenza A et B, suivant le protocole fourni par le fabricant (DAKO Diagnostic). Les cellules

* Les cellules MDCK doivent être trypsinisées avant le test afin de pouvoir les compter (cf 3.4.2).

infectées sont donc fixées sur lame à l'acétone, puis incubées avec un mélange d'anticorps monoclonaux conjugués au FITC et dirigés contre les protéines M et NP de la souche influenza A. Après lavage et montage de la préparation, les échantillons sont observés au microscope épifluorescent.

Préparation des lames : Les cellules sont tout d'abord centrifugées (200 g x 10 min) et le surnageant est éliminé. Le culot de cellule est alors lavé par re-suspension dans du PBS et en répétant l'étape de centrifugation/élimination du surnageant. Les cellules sont finalement re-suspendues dans un petit volume de PBS pour maintenir la viabilité. 25 µL de suspension de cellules sont ensuite déposés sur le puits d'une lame et laissés à sécher complètement à température ambiante, sous la hotte. L'échantillon est alors fixé pendant 10 min dans 50 µL d'acétone frais (en chambre humide). A la fin de cette étape, les lames fixées peuvent être conservées, avant coloration, à 4°C pendant une nuit ou jusqu'à deux semaines à -70°C.

Coloration : Le réactif A (contenant les anticorps) et le fluide de montage doivent être mis à température ambiante 5 min avant leur utilisation. Une étape de blocage de l'échantillon à la caséine peut alors être réalisée mais est facultative. 25 µL de réactif A sont ensuite déposés sur le puits en s'assurant que l'aire est complètement recouverte. Puis la lame est incubée en chambre humide pendant 15 min à 37°C en s'assurant que le réactif ne sèche pas (coloration non-spécifique). L'excès de réactif est lavé avec du PBS, avant de déposer la lame dans un bain de PBS sous agitation pendant 5min. La lame est ensuite mise à sécher sous hotte à température ambiante. Lorsque qu'elle est sèche, une goutte de fluide de montage est déposé sur le puits et recouverte d'une lamelle, en s'assurant d'éviter la formation de bulles d'air. Les lames sont ensuite observées au microscope aux grossissements x200-x500. Les cellules infectées présenteront une fluorescence intracellulaire, nucléaire et/ou cytoplasmique verte. Les cellules non-infectées seront colorées par le contre colorant (Bleu d'Evans) et présenteront une couleur rouge.

3.6.3 Test d'hémagglutination (test HA)

Le test repose sur la capacité de l'antigène HA du virus influenza à induire une réaction d'hémagglutination lorsque mis en présence d'érythrocytes. L'échantillon viral à doser va être dilué en série dans une plaque 96-puits à fonds coniques, puis une concentration connue de globules rouges de poulets (RBCs) est ajoutée dans chaque puits. La réaction d'hémagglutination forme un réseau entre les globules rouges et les particules virales, ce qui empêche la sédimentation des RBCs au fond du puits. La plaque est alors lue après 1h d'incubation afin de déterminer la dernière dilution présentant une réaction d'hémagglutination complète.

Préparation de la solution d'érythrocytes : Le jour même, il faut préparer une solution stock à 0.3% RBC dans du PBS ($\sim 2.4 \times 10^7$ RBCs/mL) à partir de la solution fournie par le fabricant (Charles River, Canada) et la conserver à 4°C jusqu'à utilisation.

Préparation des dilutions d'échantillons : Pour chaque échantillon, 100 µL de PBS sont déposés dans chaque puits sur deux lignes (à l'exception du premier puits de la première ligne). Après décongélation des échantillons, 100 µL de virus sont déposés dans le premier (dilution 1) et le second puits (dilution 1/2) de la première ligne. Les dilutions en série de l'échantillon (dilution 1/2) sont réalisés à l'aide d'une (multi-) pipette sur les 2 lignes complètes (en commençant du 2^{ème} puits de la première ligne jusqu'au dernier puits de la deuxième ligne). Les 100 µL en trop du dernier puits sont éliminés. 100 µL de la solution à 0.3% de RBC (bien re-suspendue avant utilisation) sont alors déposés dans chaque puits. La plaque sera homogénéisée par légers tapotements, puis laissée une heure sous la hotte à température ambiante avant lecture.

Lecture et interprétation de la plaque: La réciproque de la valeur de la plus grande dilution, correspondant au dernier puits montrant une réaction d'hémagglutination complète, équivaut au titre HA pour 0.1 mL de RBC.

Pour l'exemple ci-après (Fig 3.2), le titre HA correspondra à 320 HA/mL. Une estimation grossière du nombre de particules virales totales (TVP) peut être donnée en considérant que, au

dernier puits présentant une réaction d'hémagglutination, la quantité de virus équivaut approximativement à la quantité connue de RBCs déposée dans le puits (Mahy et Krango, 1996).

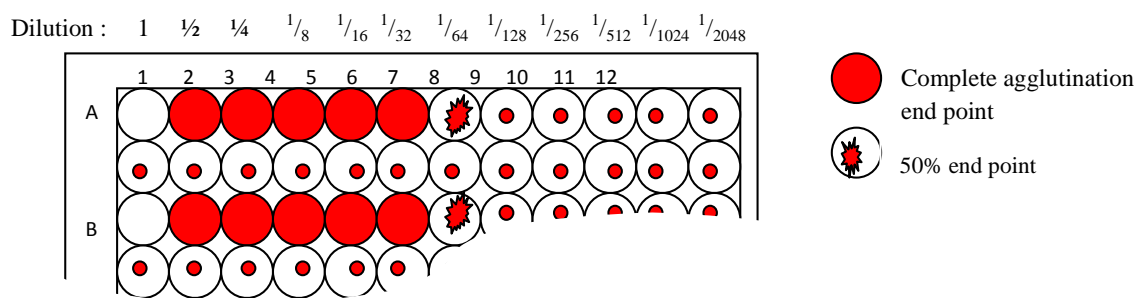


Figure 3.2: Lecture de plaque HA.

La réciproque de la dilution du dernier puits présentant une réaction complète est 32. Le titre HA équivaut donc à 32 HA/0.1mL RBC, soit 320 HA/mL.

3.6.4 Test d'infectivité (test TCID₅₀)

Le test TCID₅₀ (median Tissue Culture Infective Dose) est utilisé afin de déterminer le titre infectieux d'un échantillon donné. Ce test se réalise sur les cellules MDCK de référence infectées par des dilutions en série de l'échantillon viral, puis incubées pendant une semaine. La lecture des plaques consiste à déterminer jusqu'à quelles dilutions on peut observer des effets cytopathiques, caractéristiques des changements morphologiques qui surviennent lors de l'infection par l'influenza.

Préparation des cellules MDCK : Les cellules MDCK sont mises en culture la veille afin de leur laisser le temps d'adhérer au support : les cellules sont doncensemencées dans des plaques 96-puits CellBind™ (Corning), à raison de 100 µL/puits d'une solution à 0.28 x 10⁶ cells/mL (prévoir 10 mL/plaque) dans du milieu de culture (EMEM + 10% FBS). Les plaques sont ensuite mises à incuber, à 37°C et 5% de CO₂, jusqu'au lendemain (24h). Le jour du test, les plaques contenant les cellules sont rincées 2 fois avec du PBS (multi-pipette), avant d'y ajouter 100

μL /puits de milieu d'infection (EMEM+10% FBS + HEPES +Trypsine) sur les 6 premières lignes (A à F) et 200 μL /puits pour les deux dernières lignes (G et H) servant de contrôles. Les plaques sont ensuite remises à l'incubateur pour pouvoir préparer séparément les dilutions virales.

Préparation des dilutions d'échantillons : en évitant la première colonne, 100 μL /puits de milieu d'infection (EMEM+10% FBS + HEPES +Trypsine) sont déposés dans les 6 premières lignes (A à F) de nouvelles plaques 96-puits (Costar, #3595). Dans la première colonne (A à F) sont ensuite déposés 250 μL /puits de l'échantillon viral dilué au $1/100^{\circ}$. Les dilutions en séries au $1/5^{\circ}$ (50 μL de puits en puits) sont ensuite réalisées à l'aide d'une multi pipette, et 100 μL /puits de dilutions virales sont ensuite déposés dans les puits correspondants des plaques contenant les cellules MDCK (en commençant par les plus faibles dilutions). Tous les puits (contrôles et échantillons) doivent être remplis à 200 μL . Les cellules sont ensuite remises à l'incubateur pour 1 semaine, à 35°C et 5% CO_2 , en atmosphère humide (Tupperware).

Lecture et interprétation de la plaque : 1 semaine plus tard, les plaques sont examinées au microscope afin de compter les puits présentant un effet cytopathique (Fig. 3.3). Les titres infectieux sont alors calculés en appliquant la méthode de Speaman-Karber (1931).

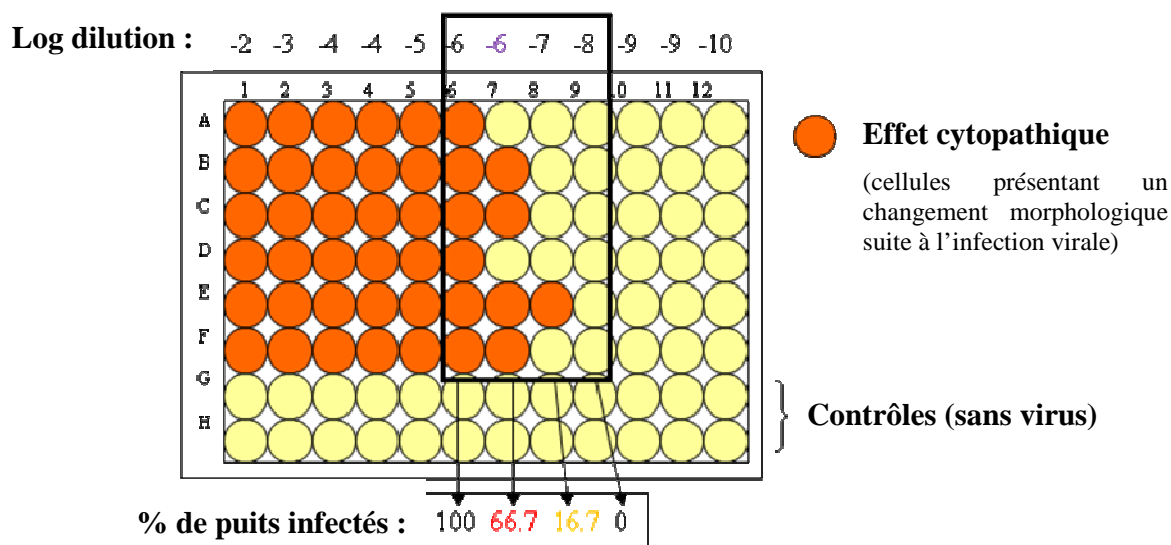


Figure 3.3: Lecture de plaque TCID_{50} .

Le point TCID₅₀ correspond au point de dilution pour lequel 50% des puits sont infectés.

Pour l'exemple de plaque ci-dessus, la valeur TCID₅₀ serait :

$$\begin{aligned} \text{Distance proportionnelle (à 50\%)} &= (\%>50\%) - 50\% / [(\%>50\%) - (\%<50\%)] \\ &= (66.7\% - 50\%) / [66.7\% - 16.7\%] = 0.3 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Log ID}_{50} &= (\log \text{dilution}>50\%) + [\text{distance Prop.} \times \log (\text{facteur dilution})] \\ &= (-6) + [0.3 \times \log(5)] = -5.8 \end{aligned}$$

$$\text{ID}_{50} = 10^{-5.8} \Rightarrow 10^{5.8} \text{ TCID}_{50}/0.1 \text{ mL} \Rightarrow 10^{6.8} \text{ TCID}_{50}/\text{mL} = \underline{6.31 \times 10^6 \text{ TCID}_{50}/\text{mL}}.$$

Le titre infectieux correspond à 70% du titre TCID₅₀ (indications ATCC), soit 4.4x10⁶ IVP/mL.

3.6.5 SDS-PAGE et Western blot

Migration SDS-PAGE: les échantillons viraux purifiés sont tout d'abord inactivés par la chaleur (90°C x 30mins). 16.7µL de tampon d'échantillon (4x Novex NuPage LDS+50mM DTT) sont ajoutés à 50 µL d'échantillon, puis le tout est chauffés à 70°C pendant 10 min. Les échantillons (15 µL/puits) et le marqueur (Spectra Multicolor Broad range ; 10 µL/puits) sont ensuite déposés sur gel Nu-Page® 4-12% dans du tampon de migration MES (pour protéines de petites tailles). La migration se fait pendant 40 min, à raison de 200V, 500mA et 50W par gel.

Migration Western Blot : le « sandwich » est assemblé, en évitant les bulles d'air, dans l'ordre suivant de migration (borne – vers +): éponges, papier wattman, gel d'électrophorèse SDS, membrane de nitrocellulose, papier wattman, éponges. Le sandwich est ensuite placé avec un bloc de glace et un agitateur dans la cuve remplie avec du milieu de transfert froid à 4°C et dégazé. Le transfert dure 1h à 200V, 300mA et 50W, et est réussi si les standards apparaissent bien sur la membrane de nitrocellulose.

Immunodétection : après migration, la membrane est rincée dans de l'eau milli-Q, puis colorée au rouge de Ponceau afin de vérifier la présence des protéines (1-2 min). Elle est ensuite re-rincée dans de l'eau distillée jusqu'à disparition des bandes, puis bloquée dans 25 mL de réactif de

blocage pendant 45 min. Après rinçage au PBST (PBS + Tween20), la membrane est transférée dans un cylindre Navigator et 3mL de l'anticorps primaire (mouse mono IgG anti Influenza A virus, #80550, Santa Cruz Biotech) dilué au 1/1000^e dans 1% de caséine + 0.01% thimérosal y sont déposés. La membrane est alors laissée à incuber 1h à température ambiante ou toute une nuit à 4°C, puis sera rincée 3 fois en remplissant complètement le cylindre d'eau distillée. Un lavage additionnel dans 10 mL de PBST pendant 10 min est réalisé avant de mettre la membrane à incuber avec l'anticorps secondaire (HRP anti-mouse) dilué au 1/5000^e dans 1% de caséine pour au moins 1h. La membrane sera alors rincée 3 fois avec 10 ml de PBST pendant 5 min, puis rincée à l'eau Milli-Q en remplissant complètement le cylindre. La membrane sera enfin révélée sur station après incubation pendant 1 min avec 1 mL de solution ECL (BM Chemiluminescence-Blotting Substrate (POD)).

3.6.6 Microscopie électronique (NSEM)

Les échantillons purifiés sur gradient d'iodixanol sont analysés par microscopie électronique à coloration négative afin de pouvoir vérifier la morphologie et l'intégrité du virus notamment après les étapes de purification. Cette partie a été réalisée à l'Institut Armand Frappier (IAF, Laval, Qc, Canada).

CHAPITRE 4 PRODUCTION ADAPTABLE À DIFFÉRENTES ÉCHELLES DU VIRUS INFLUENZA DANS DES CELLULES HEK-293 POUR UNE PRODUCTION EFFICACE DE VACCIN.

4.1 Présentation de l'article

Le but de ce projet est de démontrer que les cellules HEK-293 représentent un système d'expression valable pour la production du vaccin influenza, en montrant que ces cellules peuvent répliquer de manière efficace différentes souches virales influenza, de la petite à la grande échelle. Cet article, accepté pour publication dans le journal *Vaccine*, fait état des différentes étapes qui ont été nécessaires afin de répondre à cette problématique : l'identification et l'optimisation des paramètres d'infection (moi, concentration de trypsine, temps d'infection et de récolte de la culture,...), la mise au point de méthodes de quantification, l'évaluation de différentes souches et variants d'influenza, ainsi que les premières étapes de purification et de caractérisation du virus, jusqu'au bioréacteur de 3L.

4.2 Scalable Production of Influenza Virus in HEK-293 Cells for Efficient Vaccine Manufacturing

Audrey Le Ru^{1,2}; Danielle Jacob¹; Julia Transfiguracion¹; Sven Ansorge^{1,2}; Olivier Henry² and Amine A. Kamen^{1,2}

¹Animal Cell Technology, National Research Council of Canada, 6100 Royalmount Avenue, Montréal, Québec, Canada H4P 2R2

²Chemical Engineering Department, École Polytechnique, Montréal, Québec, Canada, H3T 1J4

Key words: Influenza virus, HEK-293, vaccine production, suspension culture, serum-free medium, bioreactor.

4.2.1 Abstract

Cell culture processes offer an attractive alternative to conventional chicken egg-based influenza vaccine production methods. However, most protocols still rely on the use of adherent cells, which makes process scale-up a challenging issue. In this study, it is demonstrated that the HEK-293 human cell line is able to efficiently replicate influenza virus. Production in serum-free suspension of HEK-293 cultures resulted in high titers of infectious influenza viruses for different subtypes and variants including A/H1, A/H3 and B strains. After virus adaptation and optimization of infection conditions, production in 3-L bioreactor resulted in titers of up to 10^9 IVP/mL demonstrating the scale-up potential of the process.

4.2.2 Introduction

Influenza viruses are enveloped, negative stranded and segmented RNA viruses belonging to *Orthomyxoviridae* family. Hemagglutinin (HA) and neuraminidase (NA) are the two surface glycoproteins that are susceptible to antigenic variations such as “shift” and “drift” [1]. This allows new mutant virions to avoid recognition by host antibodies and cause recurring flu pandemics. These are characterized by their unpredictability of emergence and the degree of severity. More than 20 per cent of the population gets infected every year, with the elderly or very young being most affected. It is estimated that there are between 250,000 and 500,000 flu deaths per year globally [2] and vaccination is the most effective means of prevention. Annual trivalent inactivated influenza vaccines (TIVs) are composed of the most commonly found influenza strains in humans (A/H1N1, A/H3N2, B) according to the WHO recommendations.

Most human influenza vaccines are currently produced in embryonated hen's eggs. This production method benefits from decades of industrial experience, has consequently a good safety profile and is cost-effective. However, major drawbacks are associated with egg-based manufacturing of vaccine. Processes suffer from a limited capacity (one egg is approximately required to generate one vaccine dose), poor flexibility and restricted responsiveness, decreasing

their ability to meet the demand in case of pandemics [2]. Assuming that a sufficient quantity of eggs is available over the planned period, approximately 6 to 9 months might be needed for vaccine production. The low adaptability of the egg-based production process increases the risks of vaccine mismatch with circulating strains. These constraints therefore compromise the production of vaccines during an influenza pandemic, particularly if the strain is of avian origin (such as H5N1) and can not be produced in eggs [3]. Within this context, it becomes critical to explore more robust alternative production methods.

Cell culture-based production systems offer a highly attractive alternative to egg-based processes. Mammalian cell culture is now considered an established technology for the production of therapeutic proteins or vaccines in the biopharmaceutical industry. Production is operated within a closed and controlled environment, and can be readily transferred to industrial manufacturing scales. The risks for microbiological contamination are significantly reduced and allergic reactions induced by egg proteins are absent. Furthermore, it is expected that the vaccines produced by cell culture are more similar to the primary human isolate than egg-adapted viruses, inducing a higher cross-reactive protective immune response [1].

Several mammalian cell lines such as Madin Darbin Canine Kidney (MDCK) [4,5], human embryonic retinal cells (PER.C6) [6] or monkey kidney cells (Vero) [7,8] have been explored for the production of influenza particles. MDCK cells are generally considered the preferred host for vaccine production as they are highly permissive to influenza virus replication and can produce infectious particles at levels comparable with eggs [9,10]. However, these cells must be grown adherently in serum-containing medium, which renders process scale-up difficult and requires medium components of animal origin. Furthermore, production of influenza in MDCK or Vero cells might introduce antigenic changes during transmission to the new host, which could impact virus infectivity. Recent data suggest that human influenza virus can be isolated more efficiently in human than in canine cells [11].

The HEK-293 cell line has been widely used for over 30 years by the scientific community, mainly for the production of viral vectors for gene and cell therapy. The HEK-293 cells have also been validated as an efficient platform for the large-scale production of r-proteins and viral vector

by transient transfection in serum-free suspension culture [12,13]. This well documented cell line offers the advantage to be easily grown in suspension at high cell density (up to 10^7 cells/mL in batch mode) and in serum-free medium [14]. The tumorigenicity of HEK-293 cells has been evaluated by different laboratories, and a recent study [15] clearly established a relationship between tumorigenicity and the viable passage number of HEK-293 cells, which explains contradictory data reported in the literature. Also, the study concludes that use of low passage cultures (<52) should be acceptable to regulatory agencies with regard to potential tumorigenicity of HEK-293 cells. Consequently, HEK-293 cells sustain the replication and production of many viruses that are evaluated as vaccines or viro-therapeutic agents [16,17]. Numerous viral vectors produced in HEK-293 cells are currently evaluated in phase II/III clinical trials and a first protein-based therapeutic manufactured by Ely Lilly has been approved for commercialization. This is an indication of a good safety profile and possibly fast regulatory clearance for use of HEK-293 cell in manufacturing of biologics. Furthermore, it is anticipated that human cell lines best fulfill glycosylation requirements of human virus needed to ensure an efficient replication [18-20]. Additionally, because of their high susceptibility to transfection, HEK-293 clones have been co-cultured with MDCK cells to rescue influenza strains by reverse genetic techniques [21,22] and therefore, this cell line is already used as a substrate in the strategy for producing reassortant influenza strains.

This study evaluates the use of HEK-293 cells, derived from a cGMP manufactured master cell bank, as a suitable expression platform for the production of influenza vaccine. Data for the HEK-293 cultivation and infection for influenza virus production in shake-flasks (20 mL) and bioreactors (3 L) are presented and discussed in the context of a scalable process. Virus adaptation to HEK-293 cells, supported by the demonstration of the presence of influenza virus receptors (Sia2-3Gal and Sia2-6Gal) on the HEK-293 cell surface, was performed and the infection conditions (trypsin concentration and multiplicity of infection) were optimized. Various influenza subtypes were tested, including A/H1N1, A/H3N2 and B strains. Results obtained demonstrate that HEK-293 cells are capable of producing high infectious virus titers up to 10^{10} IVP/mL, thereby demonstrating that the cGMP-compliant HEK-293 expression system is a suitable platform for industrial large scale manufacturing of influenza vaccines.

4.2.3 Materials and methods

4.2.3.1 Cell lines and culture conditions

MDCK cells were obtained from the American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA) and were cultivated adherently in T75-flasks containing Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM, ATCC) with 10% fetal bovine serum (FBS), at 37°C in 5% CO₂.

The HEK-293 cell line used in this work was adapted to suspension and serum free culture [14]. Working cell banks (WCB's) for research purposes were generated from a vial of the Master Cell bank (MCB's) qualified according to current Good Manufacturing Practices (cGMP). After 2 months in culture, HEK-293 cells were discarded and a new aliquot from the WCB was thawed to maintain low-passage numbers. HEK-293 cells were cultivated at 37°C and 5% CO₂, in a serum- and animal-component free SFM4Transfx-293™ (HyQ) medium (HyClone, Waltham, MA, USA). In batch, this medium supports cell growth at density up to 1×10^7 cells/mL (data not shown).

4.2.3.2 Virus strains

Influenza viruses A/PR/8/34 (H1N1), A/WS/33 (H1N1), A/Aichi/2/68 (H3N2), A/Hong Kong/8/68 (H3N2) and B/Lee/40 were obtained from the Global Bioresource Center ATCC and were all MDCK or tissue-culture adapted. To constitute an initial viral stock, the A/PR/8/34 strain was amplified first on MDCK cells before testing infection on HEK-293 cells. As infection experiment results indicated that HEK-293 cells could be infected and could efficiently replicate influenza virus, all other influenza strains were thereafter amplified on HEK-293 and MDCK cell lines for comparison.

4.2.3.3 Infection of MDCK and HEK-293 cells

To allow for influenza replication in MDCK, the cells were washed twice with PBS before addition of fresh Virus Growth Medium (VGM) containing trypsin. "MDCK VGM" medium was composed of EMEM (ATCC) supplemented with 0.125% BSA, 1% HEPES, and 1 $\mu\text{g/mL}$ trypsin-TPCK treated (≥ 180 units/mg of protein) (USB corporation, Cleveland, OH USA). MDCK cells were then infected at 35 °C and 5% CO₂ as recommended by ATCC protocols.

Infection experiments with HEK-293 cells were performed in 125 mL polycarbonate shake flasks (Corning, CA, USA) using a working volume of 20 mL. HEK-293 cells were maintained in exponential growth phase, then centrifuged and resuspended in fresh VGM prior to infection. The "HEK-293 VGM" consisted of HyQ medium, supplemented with trypsin-TPCK treated (USB Corporation, Cleveland, OH USA) at concentrations from 1 to 5 $\mu\text{g/mL}$. During infection, all cultures were maintained at 35 °C and 5% CO₂.

4.2.3.4 Optimization of the infection parameters on HEK-293 cells

Trypsin effect on virus titer was investigated by seeding HEK-293 cells at a density of 1×10^6 cells/mL in VGM containing various concentrations of trypsin-TPCK (1, 2.5 and 5 $\mu\text{g/mL}$). Cells were then subsequently infected with A/PR/8/34 influenza strain at a multiplicity of infection (moi) of 10^{-3} Infectious Viral Particles (IVP/cell). To evaluate the effect of moi on cellular productivity, HEK-293 shake-flask cultures were seeded at 1×10^6 cells/mL, in VGM + 1 $\mu\text{g/mL}$ trypsin and infected with A/PR/8/34 at different moi (moi = 1, 10^{-1} , 10^{-3} and 10^{-5} IVP/cell). The impact of the cell density at the time of infection on influenza propagation was also investigated. A batch culture was done by seeding HEK-293 cells at 0.2×10^6 cells/mL in HyQ medium. When the culture successively reached densities of 0.5, 1, 2, 4 and 6×10^6 cells/mL, 20 mL volumes were taken in duplicate and separately infected by direct addition of 1 $\mu\text{g/mL}$ trypsin and A/PR/8/34 virus to the cells, without medium exchange. After infection, cultures were incubated at 35°C and 5% CO₂. For all the experiments, samples were taken daily at 0, 24, 48, 72, 96 and 120 hours post infection (hpi) and supernatants were stored at -80°C, until further analysis.

4.2.3.5 Bioreactor culture

A 3-L Chemap type SG bioreactor (Mannedorf, Switzerland) was used to assess the scalability of the process. The working volume was adjusted to 3.0 L and the bioreactor was equipped with two sets of 45° pitched-blade impellers with a ratio of impeller to bioreactor diameter of 0.5 and three top-mounted vertical baffles. A Chemap control unit was used to maintain the stirring speed at 80 rpm during all the runs. Surface aeration was used with a gas mix of nitrogen and oxygen at a gas flow rate of 300 standard cubic centimeters per minute (sccm). The dissolved oxygen tension (pO_2) was monitored with a polarographic oxygen electrode (Mettler-Toledo, Urdorf, Switzerland) and controlled at 40% air saturation by surface aeration. The temperature was maintained at 37 °C prior to infection and was adjusted to 35 °C after infection, by heated water circulating through a jacket. The pH was measured with a gel-filled electrode (Mettler-Toledo) and controlled at 7.15 by CO_2 or $NaHCO_3$ (7.5%, w/v) additions. Culture capacitance was measured with a Biomass Monitor 220 (Aber Instruments, Aberystwyth, UK). Bioreactors were seeded at 0.15×10^6 cells/mL in HyQ medium and cells were allowed to grow until reaching a density of 4.0×10^6 cells/mL. Cultures were then infected at this concentration by direct addition of trypsin (1 μ g/mL) and influenza virus ($moi=10^{-3}$) to the culture, without medium exchange prior to infection. Samples were taken twice a day for subsequent analysis. The Oxygen Uptake Rate (OUR) is computed from the fraction of oxygen in the gas fed to the headspace of the bioreactor using the basic equation $OUR = K_L a (C^* - C_L)$ [23], where C_L is the dissolved oxygen concentration in the bioreactor, C^* is the oxygen concentration at equilibrium with the gas phase and $K_L a$ is the mass transfer coefficient for oxygen.

4.2.3.6 Sia2-3Gal and Sia2-6Gal moiety detection assay

The presence of Sia2-3Gal and Sia2-6Gal receptors on the HEK-293 cells surface was assessed using the digoxigenin (DIG) glycan differentiation kit (Roche), as described previously [24]. The analysis was performed with two DIG-labelled lectins: *Sambucus nigra agglutinin* (SNA) which specifically binds to Sia2-6Gal residues, and *Maackia amurensis agglutinin* (MAA) which is

specific for Sia2-3Gal. Briefly, non-infected cells were first incubated with one of the two lectins of interest, followed by an incubation with a FITC-anti-DIG antibody, prior to flow cytometry analysis (FACS). As they express both Sia-Gal moieties, MDCK cells were used as a positive control for the two sialylated receptors [25]. Due to their lack of Sia2-6Gal receptors, CHO cells were used as a negative control for the SNA moiety [26].

4.2.3.7 Direct immunofluorescence

Direct immunofluorescence assays for the detection of influenza virus were performed using the IMAGEN™ Influenza Virus A and B kit (DAKO Diagnostics), according to the standard protocol provided by the manufacturer. Infected cells were fixed in acetone on a glass slide, and were labelled with FITC-conjugated monoclonal antibodies directed against the matrix (M) protein and the nucleoproteine (NP) of influenza A strain. After wash and sample preparation, treated slides were observed using an epifluorescence microscope.

4.2.3.8 Hemagglutination (HA) assays

Titration of influenza virus by hemagglutination (HA) was based on the method described by [27,28]. Serial double dilutions of the infectious samples (100µL) were performed in round-bottomed 96-well microtitre plates containing 100µL PBS. Each sample was assayed in duplicates. Into each well, 100µL of a chicken red blood cell (RBC) solution ($\sim 2.4 \times 10^7$ RBCs/mL) was added and incubated for 90 min at room temperature. The last dilution showing complete hemagglutination was taken as the end point and was expressed as HA titer unit (HA/mL). A correlation is often made between the HA titer (HA/mL) and the total virus particles (TVP/mL) assuming that the number of RBCs is equal to the number of haemagglutinating virus particles at the end point dilution ($\text{TVP/mL} = 2.4 \times 10^7 \text{ RBCs/mL} \times \text{last HA dilution}$) [27].

4.2.3.9 Virus infectivity assay (TCID₅₀)

The culture supernatants were tested for the presence of infectious viruses, essentially following a protocol described previously [4]. Titrations were performed using MDCK cells. Cells were seeded in 96-well plates at a density of 2.8×10^4 cells/well in EMEM supplemented with 10% FBS. 24 hours later, cells (80-90% confluency) were washed twice with PBS, before infection with 100 μ L of 5-fold serially diluted culture supernatants, in duplicate, in EMEM medium containing trypsin (1 μ g/mL). Plates were then incubated for 7 days at 35°C. TCID₅₀ titers were then calculated according to the method of Spearman-Kärber [29]. Infectious Viral Particle unit (IVP) was employed to express the infectious titers calculated from TCID₅₀.

4.2.3.10 Virus purification

Virus purification was performed by ultracentrifugation in 20% sucrose cushion [30] followed by OptiprepTM gradient ultracentrifugation. A 18% Iodixanol starting concentration solution was used [31], and ultracentrifugation was performed for 6 h, at 350,000 g and 4°C (Sorvall, rotor 65V13). Fractions of 1mL were collected and assayed for the viral infectivity.

4.2.3.11 SDS-PAGE and western blot

Purified samples were analyzed by SDS-PAGE under reducing conditions using NuPAGE[®] 4-12% ready gels and Ponceau red for the detection of the protein bands. Western blot Analysis was performed using specific antibodies directed against HA of H1N1 Influenza A virus (Santa Cruz Biotech, CA, USA).

4.2.3.12 Negative Stain Electron Microscopy

Iodixanol purified samples containing influenza virus were analyzed by Negative Stain Electron Microscopy (NSEM) to verify virion morphology after purification. Total particles concentration expressed as viral particles/mL (VP/mL) of the purified virus was also quantified by NSEM according to the methods described previously [32]. The NSEM analyses were performed at the Institut Armand Frappier (IAF, Laval, Qc Canada).

4.2.4 Results and discussion

4.2.4.1 HA surface receptors on HEK-293 cGMP cells

HA is the major antigenic determinant, being responsible for attachment of the virus to sialic acid-containing host cell receptor and for membrane fusion during the infection process [33,34]. To evaluate HEK-293 cells as a potential efficient alternative to common adherent cell systems for the manufacturing of influenza virus, the presence of Sia2-3Gal and Sia2-6Gal HA receptors on the cell surface was investigated, as previously described for other cell types [6]. FACS analysis using DIG-labeled lectins clearly demonstrated the occurrence of Sia2-6Gal and the Sia2-3Gal on the membrane of HEK-293 cells (Fig.4.1). The results of the assay were confirmed with the MDCK positive control exhibiting the presence of the two lectins. HEK-293 and MDCK cells both expressed a similar high fluorescence signal with the two receptors of interest. Conversely and as expected, the CHO negative control cells showed a deficiency for SNA binding due to the lack of corresponding Sia2-6Gal sialyltransferase in these cells [26]. Therefore, the presence of both receptors on the surface of HEK-293 cells provided an early indication that this cell line could support the growth of influenza virus and represent an alternative host system for the production of influenza vaccine.

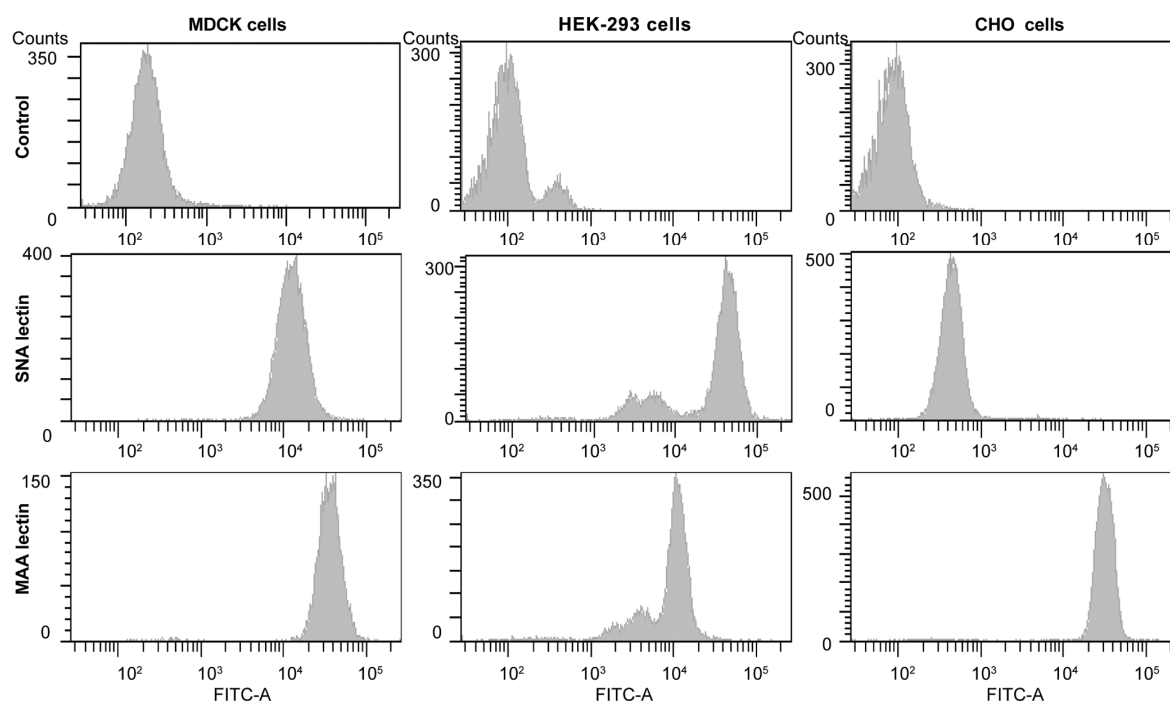


Figure 4.1: Expression of Sia2-3Gal and Sia2-6Gal receptors on the surface of HEK-293 cells. FACS analysis of MDCK, HEK-293 and CHO cells incubated without (control) or with DIG-labeled SNA or NAA lectins. Cell numbers are plotted against the fluorescence intensity of lectin-stained cells, incubated with the FITC-anti DIG Antibody.

The propagation of influenza virus using HEK-293 cells was confirmed and monitored by immunofluorescence (Fig.4.2). No signal was detected in non-infected cells, but A/PR/8/34 infected cells started to be fluorescent at 24 hpi, which was an indication of significant influenza virus replication. The number of infected cells progressively increased until 48 hpi while cell viability remaining high (>80%). Cytopathic effects (CPE), characterizing morphological changes observed in the influenza-infected host cell, were clearly visible after 72 and 96 hpi. At those time points, cells either exhibited a significant decrease in size or were fragmented. These results thus demonstrated that HEK-293 cells could indeed be infected by the A/PR/8/34 influenza strain.

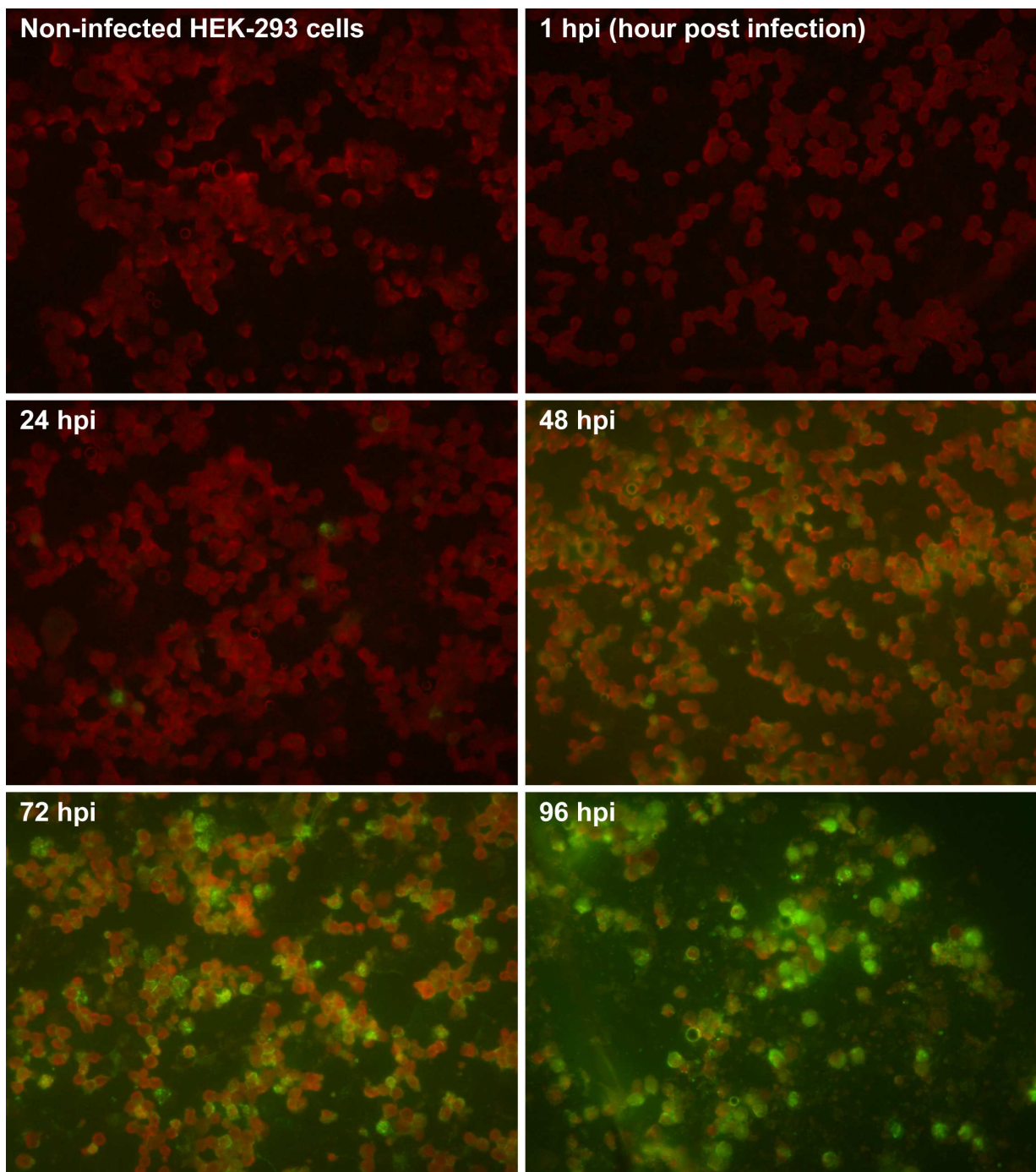


Figure 4.2: Monitoring of influenza virus propagation by immunofluorescence.

HEK-293 cells were infected with A/PR/8/34 at moi of 10^{-3} . After fixation, HEK-293 cells were detected with fluorescein labeled antibody preparation specific for the M and NP protein of influenza A viruses (x 400).

4.2.4.2 Effect of trypsin on virus growth

Serial passages of virus in a host system are possible only if highly infectious particles are formed. There appears to be a correlation between the cytopathic effect and the activation of influenza virus particles by trypsin treatment [35]. Trypsin significantly enhances the infectivity of several influenza virus strains, cleaving hemagglutinin glycoproteins HA into HA₁ and HA₂. Although this step is not required for virus assembly and release, activation of virus particles depends on this cleavage [36,37]. However, this is a host-dependent phenomenon, function of the cellular proteases activity. Trypsin activation is therefore required in PER.C6 or Vero cells but not in AGE1.CR cells [6,8,38]. The effect of trypsin on HEK-293 cell and the outcome of infection was consequently investigated, as it could potentially lead to improved virus yields.

In preliminary experiments, in absence of viral infection, the addition of 5 µg/mL trypsin to VGM was shown to have an inhibitory effect on HEK-293 cell growth leading to complete cell death within 2 days. At lower concentrations, cells continued to grow but reached only half of the maximal cell density generally observed in regular HyQ medium (data not shown). Consequently, trypsin was only added in the culture at the time of infection. HEK-293 cells were then infected with A/PR/8/34 virus ($\text{moi} = 10^{-3}$) in VGM containing various concentrations of trypsin-EDTA (0, 1, 2.5 and 5 µg/mL) and virus propagation was monitored by HA assay.

Trypsin concentration had a significant effect on the resulting virus titers (Fig.4.3.B). In absence of trypsin, no influenza particles (infectious or not) were detectable in culture medium even 4 days post infection. HEK-293 cells continued to grow in the same way than the non-infected cell control, showing comparable cell density or viability and undergoing a metabolic shift (at $\sim 4\text{--}5 \times 10^6$ cells/mL) during the growth phase (Fig.4.3.A).

Upon trypsin addition, the cell concentration profiles observed were typical of a viral infection. Cell growth ceased after the first day of infection and cultures entered the death phase within 2 days post infection, resulting in a decrease in both cell density and viability. Viral particle production also varied significantly as a function of the trypsin concentration used. The highest HA titers (600 HA/mL) were obtained at the lowest non-zero concentration of trypsin (1 µg/mL) and were found to generally decrease with increasing trypsin concentrations.

In the absence of trypsin, no influenza particles were detectable in HEK-293 cells. It can therefore be hypothesized that the produced virions were not sufficiently or efficiently activated by host cell proteases and could not be propagated through infection of other cells. Trypsin addition is thus clearly required for enhancing infectivity of the A/PR/8/34 influenza virus and allowing its replication in HEK-293 host cells. When HEK-293 cells were exposed to a trypsin concentration of 5 $\mu\text{g/mL}$, the non-infected cells (preliminary experiments) showed a higher death rate than the influenza infected cells suggesting that influenza virus infection might delay HEK-293 cell death under 5 $\mu\text{g/mL}$ trypsin concentration conditions. These observations are consistent with the results of studies reporting that virus infection shuts off the host protein synthesis and retards the process of apoptosis to allow virus replication [39,40].

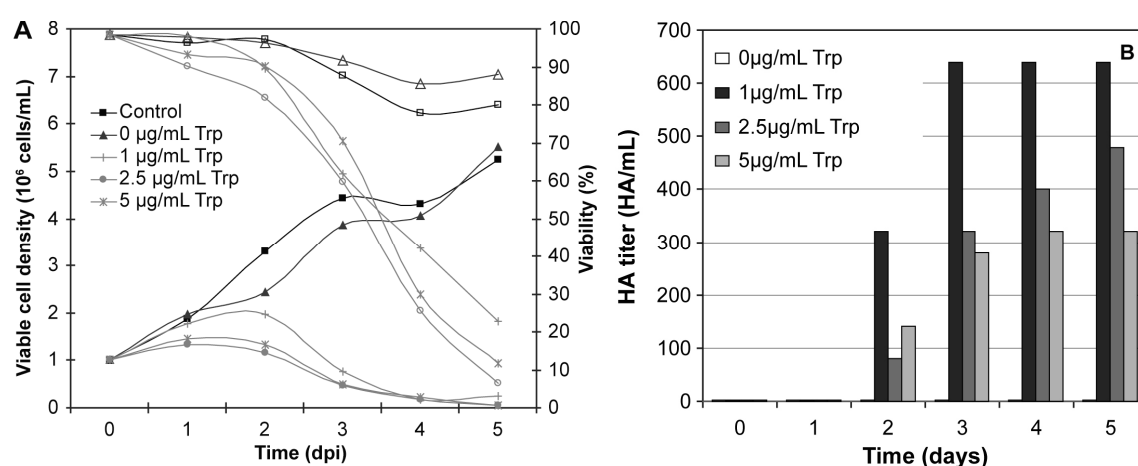


Figure 4.3: Effect of trypsin on influenza virus production.

Infection of HEK-293 cells with A/PR/8/34 (moi of 10^{-3}) in VGM using different trypsin (Trp) concentrations from 0 to 5 $\mu\text{g/mL}$ as indicated. Cell density (closed symbols), viability (open symbols) (A) and HA titers (B) were measured in culture supernatants at the different time points post infection. Batch of HEK-293 cells in HyQ medium as control.

4.2.4.3 Effect of moi on influenza virus production

To study the effect of the multiplicity of infection (moi) on influenza virus production, HEK-293 cells were infected at a trypsin concentration of 1 $\mu\text{g/mL}$. Various moi of A/PR/8/34 influenza virus strain were tested (moi=1, 10^{-1} , 10^{-3} and 10^{-5}) and viral production was monitored by HA tests (Fig.4.4).

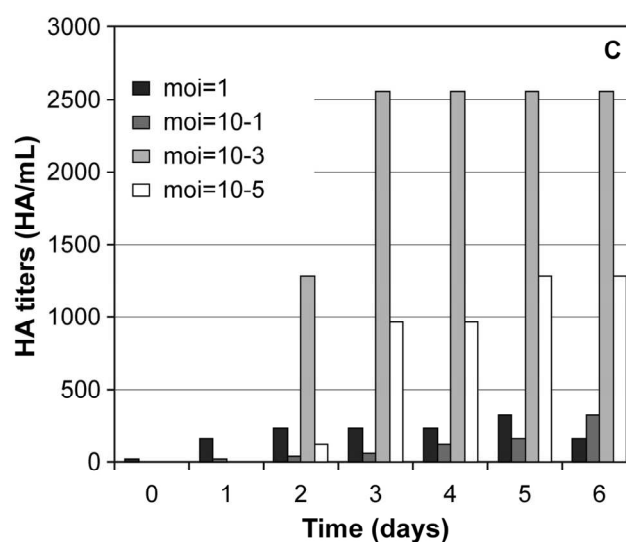


Figure 4.4: Effect of moi on influenza virus production.

Moi investigations were then done in VGM containing 1 $\mu\text{g/mL}$ of trypsin (C).

For all infected cultures, infection kinetics were similar to those of the previous trypsin study (data not shown). Whereas viability decreased rapidly after 24 hpi for an moi of 1, these effects were observed later at 48 hpi for lower moi. This delay appears to be a function of the number of influenza particles used for infection and corresponded to the time necessary for the virus to infect cells and start its replication through shut down of the host cell metabolism. Typical influenza infection dynamics comprise production and accumulation of virus components inside the cells during the early stage of infection and virus budding from host cells at the end of the replication cycle [41].

When HEK-293 cells were infected with high virus loads (moi=1), some residual virus in the culture medium could still be detected by HA assay immediately after infection. In contrast,

when HEK-293 cells were infected with an moi of 10^{-1} or lower, no virus could be detected at 1 hpi. Infection dynamics appeared to be a function of the moi used for infection. With an moi of 1, an increase in total virus titers was observed for only 24 hpi and the HA titer remained low (~ 300 HA/mL). The same observation was made at a moi of 10^{-1} which also resulted in a low particle production (< 200 HA/mL). Higher virus yields were however achieved for lower moi of 10^{-3} and 10^{-5} , at which titers of 2500 and 1300 HA/mL were obtained respectively. These observations are similar to findings for MDCK cells, indicating that using an moi of 10^{-4} leads to a 4 fold increase in HA titer compared to a moi of 1 [4]. The maximum of progeny virus titer was reached at later time point (2500 HA/mL at 72hpi) when HEK-293 cells were infected at moi of 10^{-3} , which was 48 h later than when a moi of 1 was used.

These results corroborate recent literature findings [41]. Infection of MDCK cells at low moi leads to production of virions that infect remaining cells in subsequent rounds of infection until all cells get infected. Cells that have entered into apoptotic pathway do not contribute further to virus production. In fact, only infected cells in the early stage of the infection, with low concentrations of intracellular viral proteins, will produce viral components. High levels of intracellular viral proteins, as observed in later stages of infection, lead the cells into an apoptotic pathway that stops viral production. However, apoptosis of uninfected cells can be induced – without infection – due to the presence of viral components in the culture medium, as a host defense mechanism to prevent viral replication [42]. In the present study, the infection at moi = 1, in which residual viruses were still present after infection, could have similarly induced apoptosis in the cell population before efficient virus production could have taken place. In contrast, for lower moi's of 10^{-3} and 10^{-5} , apoptosis was induced later and successive rounds of infections took place before all the cells became apoptotic and underwent cell lysis. Viral particles were mainly produced during the early stages of infection (24 to 48 hpi). After that time point, the HA titer remained high with no further yield increase. Released virions were correlated to CPE apparition.

In summary, at high moi, the number of viable virus-producing cells was reduced shortly after the infection and resulted in lower virus yields. This could be overcome by infection at low moi, which minimized early cell death and increased virus yields. The moi of 10^{-3} corresponding to the maximum virus yield achieved, was consequently used during all subsequent experiments, with a trypsin concentration of $1\mu\text{g/mL}$ at time of infection.

4.2.4.4 Production of different influenza strains using HEK-293 cells

Since the seasonal influenza vaccine consists of three strain types (A/H1N1, A/H3N2 and B), it is critical to assess whether the HEK-293 cell line is capable of reliably producing all required strains. Using the established infection parameters, several strains were therefore tested for propagation on HEK-293 cells. These comprised A/WS/33 (H1N1), A/Aichi/2/68 (H3N2), A/Hong Kong/8/68 (H3N2), B/Lee/40 and A/PR/8/34 (Table 4.1). All these strains were originally MDCK adapted and were directly used to infect either HEK-293 or MDCK, without prior adaptation. The infections of HEK-293 and MDCK cells were therefore performed at a moi of 10^{-3} in VGM supplemented with $1\mu\text{g/mL}$ of trypsin. Both cell lines were efficiently infected by the different influenza strains and showed evident CPE starting a few days post infection (dpi). HEK-293 cells showed early signs of infection 24 h later than MDCK cells. Infectious titers were quantified at harvest time when maximal HA titers were reached for all conditions. The five influenza strains tested produced infectious titers ranging from 10^5 to 10^7 IVP/mL for HEK-293 cells and from 10^8 to 10^{10} IVP/mL for MDCK. For all tested MDCK adapted strains, results indicated that MDCK produced more influenza particles than HEK-293 cells upon the first passage. However, any of the different subtypes could be efficiently amplified through HEK-293 cells, without any prior adaptation, and these cells can consequently be used directly for influenza virus rescue.

Influenza virus has the capacity to adapt to new host during virus transmission [11]. To further investigate the effect of virus adaptation, the strains were adapted on HEK-293 cells by three successive passages. The results showed that the infectious viral titers of A/PR/8/34, A/WS/33 and B/Lee/40 increased by 230, 430 and 87-folds respectively, reaching high infectious titers ranging from 10^8 to 10^{10} IVP/mL (Table 4.2). Interestingly, no correlation can be established between the HA and the infectious titers obtained, as virus activation is cell and strain dependent (See section 4.2.4.2). For example, A/PR/8/34 HA titers were similar in both cell lines (2560 HA/mL), even though a difference of 1.5 log in infectious titers was still observed after adaptation.

Table 4.1: Preliminary evaluation of different influenza strains.

Flu Strain	Subtype	HA titer (HA/mL)		Infectious Titer (IVP/mL)	
Cell lines		HEK-293	MDCK	HEK-293	MDCK
A/PR/8/34	H1N1	640	2560	2.7×10^6	2.1×10^{10}
A/WS/33	H1N1	640	1280	9.2×10^7	9.7×10^9
A/Aichi/2/68	H3N2	960	2560	8.1×10^5	7.0×10^8
A/Hong Kong/8/68	H3N2	800	2560	4.7×10^7	3.0×10^8
B/Lee/40	B	640	1280	9.3×10^7	4.3×10^{10}

Table 4.2: Virus adaptation to HEK-293 cells.

Influenza Strain	Subtype	HA titer (HA/mL)	Infectious titer (IVP/mL)	Infectious titer variation
A/PR/8/34	H1N1	2560	6.4×10^8	230 x increase
A/WS/33	H1N1	1280	2.8×10^{10}	430 x increase
A/Aichi/2/68	H3N2	160	0	lost
A/Hong Kong/8/68	H3N2	240	2.7×10^6	17 x lost
B/Lee/40	B	640	8.1×10^9	87 x increase

MDCK cells are probably best able to activate this A/PR/8/34 strain compared to HEK-293 cells. For the other H1N1 strain, HEK-293 cells allowed amplification of A/WS/33 by more than 2.5 log, to 4×10^{10} IVP/mL, surpassing the MDCK infectious titer. However, for one of the H3N2 strain, a significant loss of infectivity was observed upon adaptation, probably due to less favorable infection conditions for this particular subtype in HEK-293 cells. Additional experiments with different moi and trypsin concentrations are required to identify specific infection conditions which allow to efficiently amplify this strain. Previous studies have also

shown that significant differences in the amount of virus particles released could be observed for a same influenza strain under similar cultivation conditions but from different sources [41] and of cell strain susceptibility to virus [43]. The virus adaptation is therefore another major parameter that impacts the efficient production of influenza virus in HEK-293 cells. It could be hypothesized that titers could be further improved by allowing more passages or by adapting infection parameters to each specific strain.

4.2.4.5 Characterization of influenza viruses produced in HEK-293 cells

Before further improving influenza virus production, the A/PR/8/34 influenza particles produced in HEK-293 cells needed to be characterized. Purified virus containing supernatants were analyzed by negative stain electron microscopy. The analysis revealed that the average size (102 ± 20 nm) and morphology of budding particles were fairly uniform and more than 80% of influenza particles were still intact after purification (Fig.4.5). The pleomorphic virion population showed typical spikes corresponding to the HA and NA viral glycoproteins present on their surface [44]. These deformed budding particles appeared to be similar in both size and morphology to those produced on MDCK cells in presence of exogenous cholesterol [34]. Exogenous cholesterol was shown to inhibit virus release and produced deformed and elongated particles with multiple incomplete buds attached to each other. A second source of irregular particles could be related to cell disruption, as bud closing is very inefficient and only a small fraction of these buds are released, while the majority remain attached to the cell membrane [33,44]. However, the reason responsible for the observed extensive A/PR/8/34 virus heterogeneity is yet unclear and the role of the host in virus morphology needs to be further examined. NSEM also allowed the quantification of total virus particles at 1.68×10^{10} TP/mL. Based on this method [32], the percentage of infectious particles (sample titer: 9.25×10^8 IVP/mL) to total particles (IVP/TP) was calculated to be ~5%. This low percentage could be explained by the fact that budding may occur in the absence or with incomplete vRNPs, thus resulting in a majority of non-infectious virus being released ($\geq 90\%$).

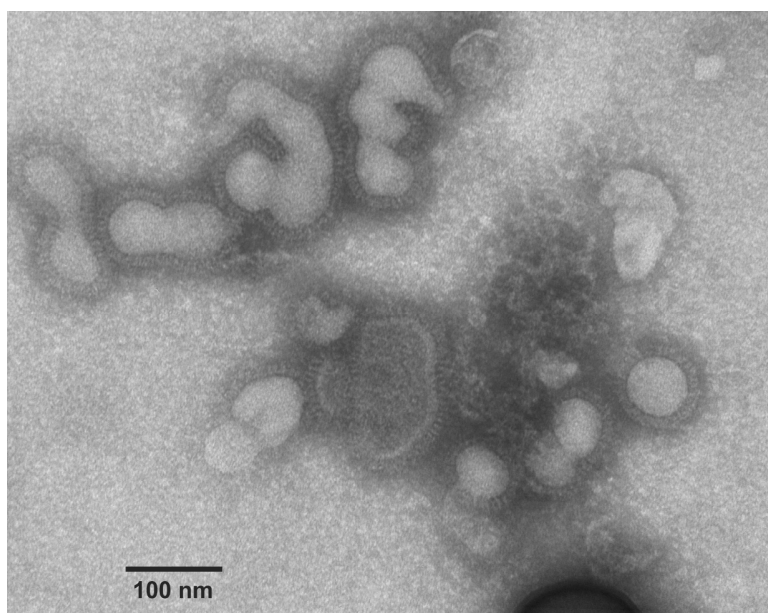


Figure 4.5: A/PR/8/34 morphology produced in HEK-293 cells.

Negative Stain Electron Microscopy showed highly pleomorphic virions in good condition with an average size of $102 \pm 20 \text{ nm}$ (60000x). Each virion presented a sharp fringe and evident spikes outside (Scale bar 100nm). Nayak and al. explained production of deformed particles due to exogenous cholesterol [34].

Furthermore, Western blot analysis and Ponceau red staining confirmed the presence of correctly cleaved HA in culture supernatants, detecting HA₁ and HA₂ subunits with molecular weights of approximately 60 kDa and 30 kDa, respectively (Fig.4.6.B). The uncleaved form (HA₀), with a size of ~90 kDa was observed in the starting material and in some of the purified fractions. Influenza HA subunits produced in HEK-293 are similar to those produced in MDCK or on eggs [45]. Host cell derived contaminants could still be observed in purified fractions (Fig.4.6.A). More work is needed to assess if these unknown bands are viral or non-viral related, but this falls beyond the scope of this work. In the concentrated and purified fractions, all the three HA forms were present. These results indicated that the influenza particles produced in HEK-293 cells are activated and present all influenza virus characteristics needed to infect cells and replicate.

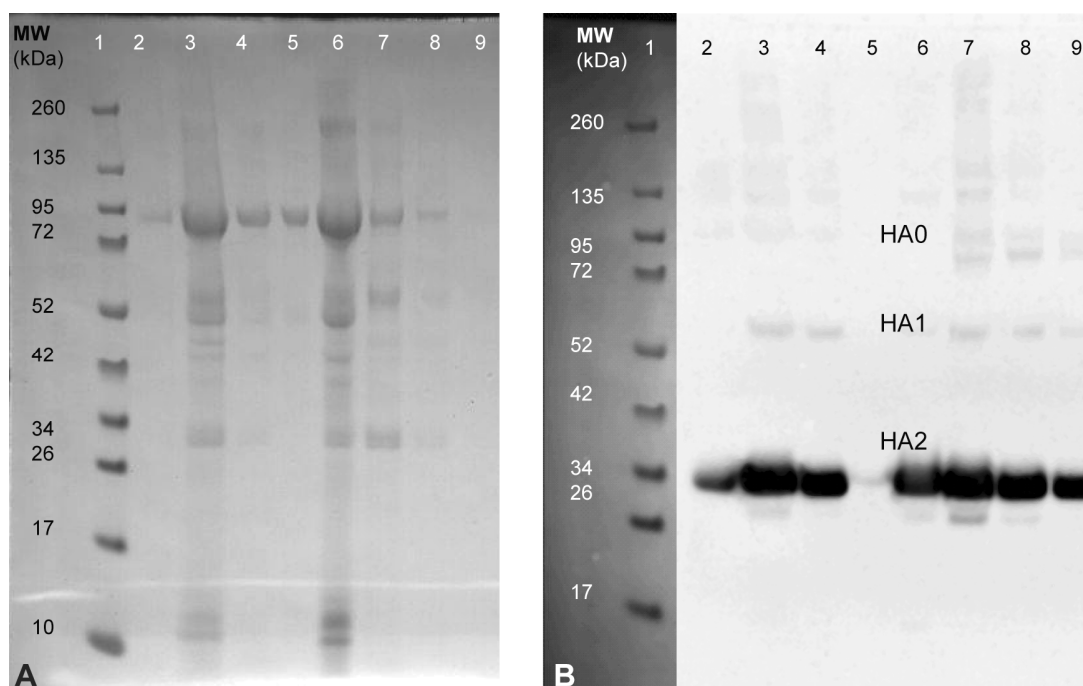


Figure 4.6: SDS-PAGE (A) and Western blot (B) analysis of influenza A/PR/8/34.

Samples before and at each step of purification were analyzed. By western blot, the non-reduced HA₀ (95 kDa) and reduced bands HA₁ (63 kDa) and HA₂ (34 kDa) were clearly visible, particularly in purified fractions. Lane 1: molecular weight markers; lane 2: supernatant; lane 3: benzonase treatment + 0.45µm filtration; lane 4: 18% iodixanol containing virus; lane 5-9: purified fractions 1-5.

4.2.4.6 Effect of cell density at infection on viral production

A set of experiments was designed to determine the effect of cell density on virus production. These experiments were done without medium exchange at the time of infection; as such operation is hardly transposable to industrial scale. Cells were taken from the same batch culture and successively infected at 0.5, 1, 2, 4 and 6x10⁶ cells/mL. At all but the highest density, the cells were in their exponential growth phase. Similar cell concentration profiles were observed in all cultures after infection (Fig.4.7.A), with cells maintaining growth up 24 h after infection. Thereafter, the cell viability drastically declined to less than 50% over 2 dpi. In the case of the culture infected at 6 x10⁶ cells/mL a shift of 24 h was observed in the production profile. The HA titer was found to increase with the cell density at infection (Fig.4.7.B). Except at the highest cell

density, a 2 fold increase in HA titer was observed for each 2 folds increase in cell density. The maximum HA titers attained were 10 240 HA/mL at 48-72 hpi in both cultures infected at 4 and 6×10^6 cells/mL. Similarly, infectious titers were increased from 10^7 , corresponding to the lowest cell density (0.5×10^6 cells/mL), to a maximum of 10^9 IVP/mL at 72 hpi for the cultures infected at 4 and 6×10^6 cells/mL (Fig.4.7.C). It could be noticed that the sooner the viability dropped, the earlier the virus was released. Similar to HA titer, the highest cell concentration (6×10^6 cells/mL) did not show any further increase in infectious titer compared to 4×10^6 cells/mL. Beyond this cell density at infection, it is likely that some metabolic limitation hinders the production of total and infectious influenza particles during the infection. Specific productions were calculated from infectious titers at 3 dpi (Table 4.3). Infection at 4×10^6 cells/mL without medium exchange resulted in the most efficient production conditions with a 3-fold increase in specific production when compared to an infection at 1×10^6 cells/mL without medium exchange.

Table 4.3: Specific production of influenza virus in HEK-293 cells.

Samples	Infectious Titer 3 dpi (IVP/mL)	Max cell density (cells/mL)	Specific infectious virus production (IVP/cell)
1×10^6 cells/mL (w)	3.1×10^8	2.34×10^6	134
0.5×10^6 cells/mL (w/o)	1.3×10^7	0.6×10^6	22
1×10^6 cells/mL (w/o)	1.1×10^8	1.7×10^6	64
2×10^6 cells/mL (w/o)	2.1×10^8	3.21×10^6	65
4×10^6 cells/mL (w/o)	1.3×10^9	5.82×10^6	223
6×10^6 cells/mL (w/o)	1.1×10^9	7.92×10^6	139

For the 4×10^6 cells/mL, we observed that HA titer reached close to its maximum at 2 dpi, and remained stable over time, whereas infectious titer appeared to reach a maximum titer (4.26×10^9 IVP/mL) at 2 dpi and decreased below 10^9 IVP/mL at 4 dpi. This maximum value was reached when the viability decreased below 50% at 2 dpi (Fig.4.7.D). This infectious titer was obtained with a maximal cell density of 5.82×10^6 cells/mL during the run, which corresponds to a maximal specific production of 732 infectious particles per cell.

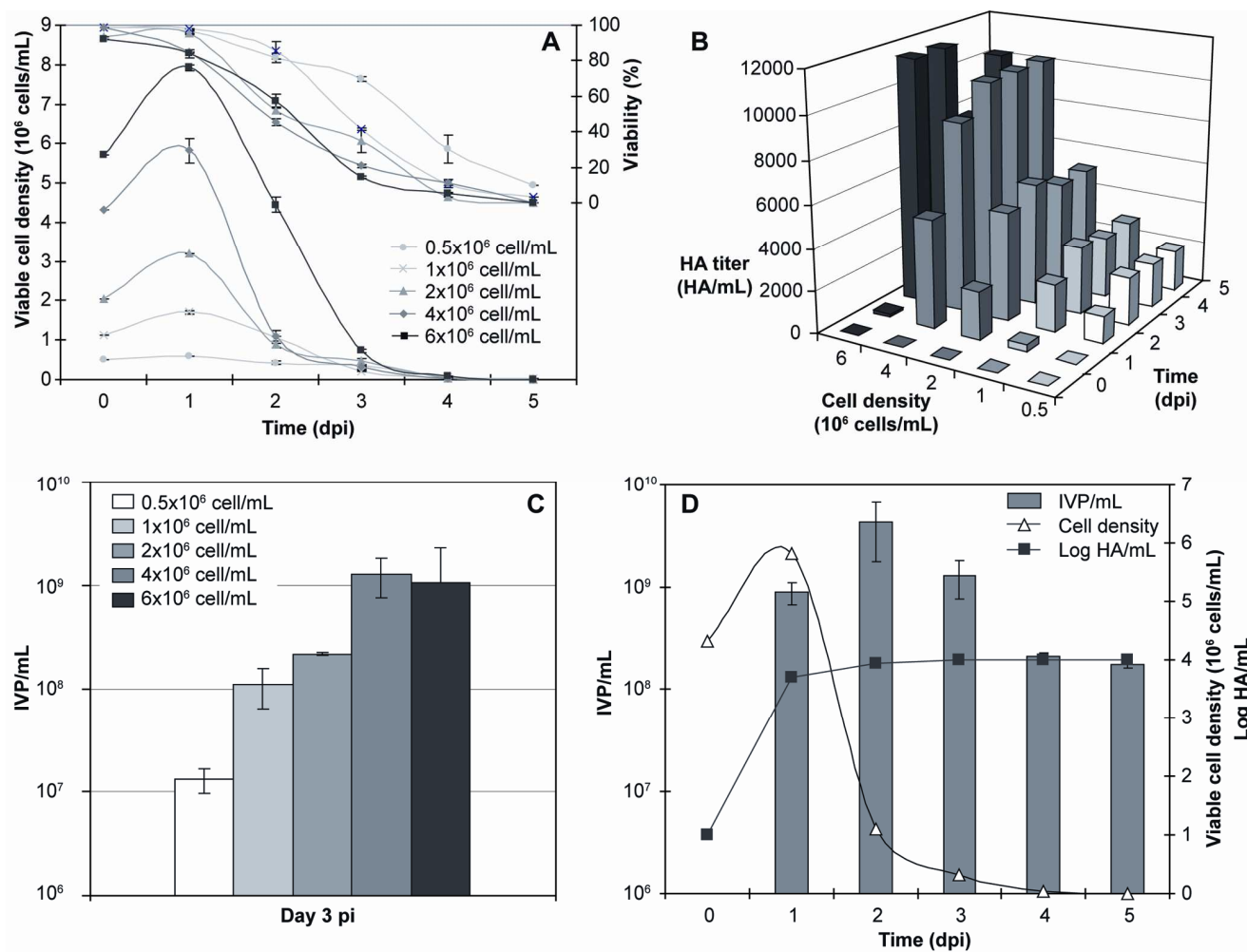


Figure 4.7: Effect of cell density at infection.

HEK-293 cells were infected with A/PR/8/34 at various cell densities ranging from 0.5 to 6×10^6 cells/mL, without medium exchange prior infection. Similar kinetic profiles were observed at the different densities (A) (\pm S.D. of duplicates). HA (B) and infectious titers (C) were determined in the culture supernatants collected at different days post infection (\pm S.D. of duplicates). Growth and virus production kinetic were correlated for 4×10^6 cells/mL density (D).

Compared with the initial cultures infected at 1×10^6 cells/mL, increasing the cell density by 4-fold led to an improvement of 4-fold in HA titer and one log in infectious titer. It should also be emphasized that eliminating the medium exchange step (1×10^6 cells/mL condition) did not alter significantly the infectious titers, despite a half specific production (Table 4.3). These results corroborated previous bioreactor improvements that showed that washing steps and medium exchange were not required for MDCK influenza infection [46,47]. Since infectious titers are not stable over time [4], culture harvest in bioreactor should take place within 2 or 3 dpi depending on the cell concentration and viability. Influenza yield appeared then to depend on the one hand on high cell yield, thus optimal growth of the host cell and on the other hand on the time of harvest, the moi and the trypsin concentration of the VGM.

4.2.4.7 Influenza virus production in 3-L bioreactor

Eliminating the medium exchange step before infection is a major advantage for process robustness and cost of goods reduction as well as minimization of contamination risks. However, substrates could become limiting due to extended culture time and metabolites could accumulate to inhibiting levels. Substrates and metabolites uptake and release have then been measured to document the scalability of the process using the optimized conditions previously described. Cells were inoculated in 3-L bioreactor at 0.15×10^6 cells/mL and infected at $\sim 4 \times 10^6$ cells/mL without medium exchange. The production was assayed with HA and TCID₅₀ and bioreactor parameters, as pH, temperature, dissolved oxygen were maintained constant during the run whereas oxygen uptake rate (OUR) and permittivity signals were on-line monitored (Fig.4.8.A).

The first part of the process (0-97h, “cell growth”) represented the growth of HEK-293 cells in bioreactor resulting in an OUR increase from 0 to 0.5 mmol/L*h (Fig.4.8.A). Cells were infected 4 days post inoculation at 97 hours. At the time of infection, the cells were still in the exponential phase with a viability of 96 % as batch control cells continued to grow until 145 hours before

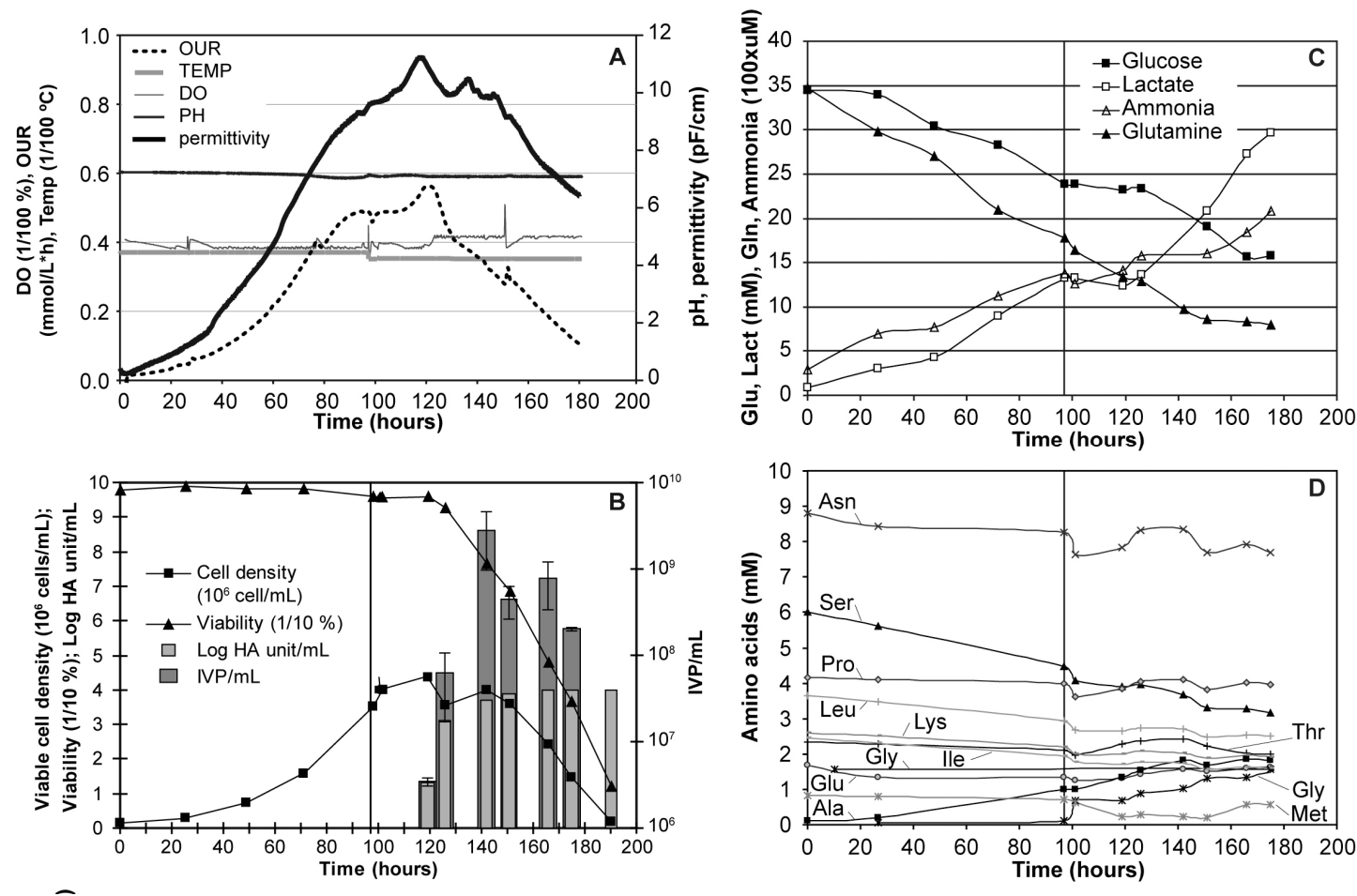


Figure 4.8: Influenza production in 3-L bioreactor.

Bioreactor monitoring data (A) and viable cell density, viability, HA and infectious titer (B) were plotted along time (\pm S.D. of duplicates). Glucose, lactate, glutamine and ammonia were measured daily (C). The vertical lines indicate the time of infection (97 h) without medium exchange. Both infectious and total particle titers were maintained up to 10240 HA/mL and 10^9 IVP/mL during the scalable process.

entering a stationary phase (data not shown). As previously observed, infected cells continued to grow for 24 hours post infection (hpi) before cell growth ceased (Fig.4.8.B). A maximal viable cell density of only 4.37×10^6 cells/mL reached at 24 hpi indicated that HEK-293 cells were no more under optimal growth conditions following infection. Viability drastically decreased after 24 hpi. Parallel to cell growth, oxygen consumption increased for 24 hpi, before decreasing and finally completely stopping at about 190 hours (= 93 hpi) when all cells were dead after virus replication (97-190 h, “virus production”).

As reported previously for HEK-293 and several other cell lines [48,49], the oxygen uptake rate and the capacitance signals are both well correlated to the viable cell concentration during the growth phase (pre-infection). The OUR continued to increase after infection and reached a maximum at around 24 hpi (Fig.4.8.A). The OUR peak appears related to the virus production kinetics. This suggests using the OUR or capacitance signals to on-line determine the optimal time point of virus harvest. The relationship between oxygen uptake rate and virus production has already been observed [50,51], as oxygen demand starts to decrease concomitantly with cell viability during viral replication.

After infection, virus titer could be quantified by HA and TCID₅₀ assays after a delay of 24 hpi (Fig.4.8.B). HA and infectious titers measured in the 3-L bioreactor culture were similar to the titers obtained in shake-flask experiments. A maximum virus yield of 10240 HA/mL (4.01 log HA unit/mL) and 2.81×10^9 IVP/mL were reached at 2 dpi, which corresponded to a maximal specific production of 643 infectious particles per cell, comparable to the maximal specific production of 732 IVP/cell obtained under similar condition in shake-flask experiments. As previously observed, the maximum infectious titer was reached at 142 hours with a cell viability approaching 70% two days post infection (Fig.4.8.B). Titers and specific production were comparable to those obtained at small scale for the same cell density at infection, despite a non-optimal cell growth which is known to importantly affect virus yield [47]. After infection, virus titer increased after a delay of 24 hpi whereas first changes in amino acid metabolism could be observed within 4 hpi (Fig.4.8.D). Overall the virus production progress could be described as two distinct phases: (1) 0-24 hpi virus entry and switch of metabolism, (2) 24-93 hpi virus accumulation, cell damage and release of intracellular pools of metabolites into the medium.

Metabolite concentration profiles for glucose, glutamine, lactate and ammonium are shown (Fig. 4.8.C). Glucose and glutamine, as carbon sources, were not completely consumed during cell growth and did not reach limiting concentrations. Glucose concentration was still at 23.8 mM and glutamine at 17.5 mM just prior to infection. Total consumption and production of metabolites could be compared. From 10.9 mM glucose consumed 12.9 mM lactate was produced during cell growth (97 h), resulting in an overall molar yield of $Y_{lac/gluc} = 1.18$. During virus production 8.0 mM glucose were metabolized to 15.8 mM lactate (75 hpi), corresponding to $Y_{lac/gluc} = 1.98$. Degradation and uptake of 1.72 mM glutamine resulted in 1.09 mM ammonium during cell growth, resulting in an overall molar yield of $Y_{amm/gln} = 0.63$. During virus replication still 0.97 mM glutamine was used and led to 0.71 mM ammonium production, thus $Y_{amm/gln} = 0.73$ mM. During the infection phase, the infected HEK-293 cells exhibited an increase in both glucose uptake and lactate production rates. In contrast to glucose, glutamine consumption and ammonia production did not vary significantly before and after infection. During virus production, amino acids concentrations changed within the first 10 h (Fig. 4.8.D) but no significant limitations were observed thereafter. Similar observations have been reported for MDCK cells following infection by influenza virus [46]. HEK-cells glycolytic fluxes were reported to increase during the infection phase [52-54] as cells became more oxidative particularly at the onset of the infection phase. This could be related to an increased energy requirement for viral protein synthesis.

4.2.5 Conclusion

To be of commercial interest for the purpose of vaccine production, a mammalian cell line should be well defined, preferably grown in suspension to high cell densities in serum-free medium and support the cost-effective replication of all influenza A and B strains to high titers in a short period of time. It results from the present work that HEK-293 cells fulfill these requirements. Virus yield varied a lot by varying the moi, indicating that this parameter is critical in HEK-293 cells infection. Best results were obtained by infecting cells at low moi (10^{-3} IVP/cell). Analysis of the effect of trypsin concentration in the infection medium showed also variations in the resulting yields and was set under standard conditions at $1\mu\text{g/mL}$. Using a serum- and animal-

component free commercial medium (SFM4Transfx-293™ from Hyclone), influenza virus production was only limited beyond 4×10^6 cells/mL. Due to the frequent antigenic changes observed for the circulating influenza viruses it is necessary for influenza vaccine production that the production cell line is robust in its ability to produce high viral titers from a wide variety of subtypes and antigenic variants of influenza virus. We demonstrated that HEK-293 cells, readily grown in suspension in serum free culture medium, are capable of producing high titers of infectious influenza viruses for the different subtypes A/H1, A/H3 and B strains, without any prior adaptation. After virus adaptation to cells and scale-up to 3-L bioreactor, optimized infection conditions resulted in high infectious virus titers up to 10^9 IVP/mL, similar to those obtained with the MDCK reference cell line. Produced particles were infectious and presented all influenza virus characteristics. Consequently, we concluded that our industrial cGMP-compliant HEK-293 expression platform may be a suitable system for industrial manufacturing of influenza vaccines.

4.2.6 Acknowledgments

The authors would like to thank all members of the ACT group at BRI for help and support. In particular we would like to acknowledge Lucie Bourget for FACS analysis, Rosa Tran and Louis Bisson for expert assistance and Andre Migneault for art work.

4.2.7 References

- [1] Bardiya N, Bae JH. Influenza vaccines: recent advances in production technologies. *Appl Microbiol Biotechnol* 2005; 67: 299-305.
- [2] Belsey M, Evans D, Pavlou A, Savopoulos J. Growth drivers and resistors of the influenza market: The importance of cell culture flu. *J Commercial Biotechnol* 2005; 12(2): 150-155.
- [3] Fedson DS. Pandemic influenza and the global vaccine supply. *Clin. Infec. Dis.* 2003; 36: 1552-1561.
- [4] Rimmelzwaan GF, Baars M, Claas ECJ, Osterhaus ADME. Comparison of RNA hybridization, hemagglutination assay, titration of infectious virus and immunofluorescence

- as methods for monitoring influenza virus replication in vitro. *J Virol. Meth.* 1998; 74: 57-66.
- [5] Voeten JTM, Brands R, Palache AM, van Scharrenburg GJM, Rimmelzwaan GF, Osterhaus ADME, et al. Characterization of high-growth reassortant influenza A viruses generated in MDCK cells cultured in serum-free medium. *Vaccine* 1999; 17: 1942-1950.
- [6] Pau MG, Ophorst C, Koldijk MH, Schouten G, Mehtali M, Uytdehaag F. The human cell line PER.C6 provides a new manufacturing system for the production of influenza vaccines. *Vaccine* 2001; 19: 2716-2721.
- [7] Kistner O, Barrett PN, Mundt W, Reiter M, Schober-Bendixen S, Dorner F. Development of a mammalian cell (Vero) derived candidate influenza virus vaccine. *Vaccine* 1998; 16(9-10): 960-968.
- [8] Youil R, Su Q, Toner TJ, Szymkowiak C, Kwan WS, Rubin B, and al. Comparative study of influenza virus replication in Vero and MDCK cell lines. *J Virol Methods* 2004; 120:23-31.
- [9] <http://www.who.int/csr/resources/publications/influenza/whodscsrncs20025rev.pdf>
- [10] Belsey MJ, De Lima B, Pavlou AK, Savopoulos JW. From the analyst's couch : Influenza vaccines. *Nature reviews* 2006; 5: 183-184.
- [11] Zhirnov OP, Vorobjeva IV, Saphonova OA, Poyarkov SV, Ovcharenko AV, Anhlán D, et al. Structural and evolutionary characteristics of HA, NA, NS and M genes of clinical influenza A/H3N2 viruses passaged in human and canine cells. *J Clinical Virology* 2009, 45: 322-333.
- [12] Durocher Y, Perret S, Kamen A. High-level and high-throughput recombinant protein production by transient transfection of suspension-growing human 293-EBNA1 cells. *Nucleic Acids Res.* 2002; 30(2):E9.
- [13] Pham PL, Perret S, Cass B, Carpentier E, St-Laurent G, Bisson L. Transient Gene Expression in HEK293 Cells: Peptone Addition Posttransfection Improves Recombinant Protein Synthesis. *Biotechnol Bioeng.* 2005; 90(3):332-44.

- [14] Côté J, Garnier A, Massie B, Kamen A. Serum-Free Production of Recombinant Proteins and Adenoviral Vectors by 293SF-3F6 Cells. *Biotechnol Bioeng* 1998; 59(5):567-75.
- [15] Shen C, Gu M, Song C, Miao L, Hu L, Liang D, et al. The tumorigenicity diversification in human embryonic kidney 293 cell line culture *in vitro*. *Biologicals* 2008; 36:263-268.
- [16] Côté J, Bourget L, Garnier A, Kamen A. Study of Adenovirus Production in Serum-Free 293SF Suspension Culture by GFP-Expression Monitoring. *Biotechnol Prog* 1997; 13: 709-714.
- [17] Ansorge S, Lanthier S, Transfiguracion J, Durocher Y, Henry O, Kamen A. Development of a scalable process for high-yield lentiviral vector production by transient transfection of HEK293 suspension cultures. *J Gene Med* 2009; 11: 868-876. doi: 10.1002/jgm.1370.
- [18] Sugrue RJ. Viruses and Glycosylation. *Methods in Molecular Biology, Glycovirolgy Protocols*. Humana press Inc. 2007, Totowa, NJ.
- [19] Vigerust DJ, Shepherd VL. Virus glycosylation: role in virulence and immune interactions. *TRENDS in Microbiology* 2007; 15(5).
- [20] Schwarzer J, Rapp E, Hennig R, Genzel Y, Jordan I, Sandig V, et al. Glycan analysis in cell culture-based influenza vaccine production: Influence of host cell line and virus strain on the glycosylation pattern of viral hemagglutinin. *Vaccine* 2009; 27:4325-4336.
- [21] Hoffmann E, Krauss S, Perez D, Webby R, Webster RG. Eight-plasmid system for rapid generation of influenza virus vaccines. *Vaccine* 2002; 20: 3165-3170.
- [22] Mazur I, Anhlán D, Mitzner D, Wixler L, Schubert U, Ludwig S. The proapoptotic influenza A virus protein PB1-F2 regulates viral polymerase activity by interaction with the PB1 protein. *Cell Microbiol* 2008; 10(5): 1140-1152.
- [23] Kamen AA, Bédard C, Tom R, Perret S, Jardin B. On-Line Monitoring of Respiration in Recombinant-Baculovirus Infected and Uninfected Insect Cell Bioreactor Cultures. *Biotech BioEng* 1996; 50: 36-48.
- [24] Govorkova EA, Matrosovich MN, Tuzikov AB, Bovin NV, Gerdil C, Fanget B, and al. Selection of Receptor-Binding Variants of Human Influenza A and B Viruses in Baby Hamster Kidney Cells. *Virology* 1999; 262: 31-38.

- [25] Gambaryan AS, Robertson JC, Matrosovich MN. Effects of egg-Adaptation on the Receptor-Binding Properties of Human Influenza A and B Viruses. *Virology* 1999; 258: 232-239.
- [26] Lee EU, Roth J, Paulson JC. Alteration of terminal glycosylation sequences on N-linked oligosaccharides of Chinese hamster ovary cells by expression of beta-galactoside alpha 2,6-sialyltransferase. *J Biol Chem* 1989; 264(23):13848-55.
- [27] Mahy BWJ, Kangro HO. *Virology methods manual*. London: Academic Press, 1996: 41-3.
- [28] Kalbfuss B, Knöchlein A, Kröber T, Reichl U. Monitoring influenza virus content in vaccine production: Precise assays for the quantitation of hemagglutination and neuraminidase activity. *Biologicals* 2008; 36: 145-161.
- [29] Karber G. Beitrag zur kollektiven behandlung pharmakologischer reihenversuche. *Exp Pathol Pharmacol* 1931; 162: 480-483.
- [30] Transfiguracion J, Jaalouk DE, Ghani K, Galipeau J, Kamen A. Size-exclusion chromatography purification of high-titer vesicular stomatitis virus G glycoprotein-pseudotyped retrovectors for cell and gene therapy applications. *Hum Gene Ther*. 2003; 14(12): 1139-53.
- [31] Ford T, Graham J, Rickwood D. Iodixanol: A Nonionic Iso-osmotic Centrifugation Medium for the Formation of Self-Generated Gradients. *Analytical Biochemistry* 1994; 220: 360-366.
- [32] Alain R, Nadon F, Séguin C, Payment P, Trudel M. Rapid virus subunit visualization by direct sedimentation of samples on electron microscope grids. *J Virol Meth* 1987; 16: 209-216.
- [33] Nayak DP, Ka-Wai Hui E, Barman S. Assembly and budding of influenza virus. *Virus Research* 2004; 106 : 147-165.
- [34] Nayak DP, Balogun RA, Yamada H, Hong Zhou Z, Barman S. Influenza virus morphogenesis and budding. *Virus Research* 2009; doi:10.1016/j.virusres.2009.05.010.

- [35] Lazarowitz SG, Compans RW, Choppin PW. Proteolytic cleavage of the hemagglutinin polypeptide of influenza virus. Function of the uncleaved polypeptide HA. *Virology* 1973; 52: 199-212.
- [36] Klenk HD, Rott R, Orlich M, Blödorn J. Activation of Influenza A Viruses by Trypsin Treatment. *Virology* 1975; 68, 426-439.
- [37] Kapteyn JC, Drissi Saidi M, Dijkstra R, Kars C, Tjon JCMSK, Weverling GJ, and al. Haemagglutinin quantification and identification of influenza A&B strains propagated in PER.C6 cells: A novel RP-HPLC method. *Vaccine* 2006; 24: 3137-3144.
- [38] Lohr V, Rath A, Genzel Y, Jordan I, Sandig V, Reichl U. New avian suspension cell lines provide production of influenza virus and MVA in serum-free media: Studies on growth, metabolism and virus propagation. *Vaccine* 2009; doi:10.1016.
- [39] Takizawa T, Matsukawa S, Higuchi Y, Nakamura S, Nakanishi Y, Fukuda R. Induction of programmed cell death (apoptosis) by influenza virus infection in tissue culture cells. *J General Virology* 1993; 74 : 2347-2355.
- [40] Kurokawa M, Koyama AH, Yasuoka S, Adachi A. Influenza virus overcomes apoptosis by rapid multiplication. *Int J Mol Med* 1999; 3(5):527-30.
- [41] Schulze-Horsel J, Schulze M, Agalaridis G, Genzel Y, Reichl U. Infection dynamics and virus-induced apoptosis in cell culture-based influenza vaccine production-Flow cytometry and mathematical modeling. *Vaccine* 2009; 27, 2712-2722.
- [42] Barber GN. Host defense, viruses and apoptosis. *Cell Death and Differentiation* 2001; 1: 113-126.
- [43] Li IWS, Chan KH, To KWK, Wong SSY, Ho PL, Lau SKP et al. Differential susceptibility of different cell lines to swine-origin influenza A H1N1, seasonal human influenza A H1N1, and avian influenza A H5N1 viruses. *J Clin Virol* 2009. Doi: 10.1016/j.jcv.09.013.
- [44] Harris A, Cardone G, Winkler DC, Heymann JB, Brecher M, White JM, and al. Influenza virus pleiomorphy characterized by cryoelectron tomography. *Proc. Natl. Aca. Sci. U.S.A.* 2006; 103(50), 19123-19127.

- [45] Kapteyn JC, Porre AM, de Rond EJP, Hessels WB, Tijms MA, Kessen H, et al. HPLC-based quantification of haemagglutinin in the production of egg- and MDCK cell-derived influenza virus seasonal and pandemic vaccines. *Vaccine* 2009; 27, 1468-1477.
- [46] Genzel Y, Fischer M, Reichl U. Serum-free influenza virus production avoiding washing steps and medium exchange in large-scale microcarrier culture. *Vaccine* 2006; 24: 3261-3272.
- [47] Genzel Y, Olmer RM, Schäfer B, Reichl U. Wave microcarrier cultivation of MDCK cells for influenza virus production in serum containing and serum-free media. *Vaccine* 2006; 24: 6074-6087.
- [48] Henry O, Dormond E, Perrier M, Kamen A. Insights Into Adenoviral Vector Production Kinetics in Acoustic Filter-Based Perfusion Cultures. *Biotech Bioeng* 2004; 86(7).
- [49] Konstantinov K, Chuppa S, Sajan E, Tsai Y, Yoon S, Golini F. Realtime biomass concentration monitoring in animal cell cultures. *Trends Biotechnol* 1994; 12:324-333.
- [50] Garnier A, Cote J, Nadeau I, Kamen A, Massi B. Scale-up of the adenovirus expression system for the production of recombinant protein in human 293S cells. *Cytotechnol* 1994; 15:145-155.
- [51] Kussow CM, Weichang Z, Gryte DM, Hu W-S. Monitoring of mammalian cell growth and virus production process using on-line oxygen uptake rate measurement. *Enzym Microb Technol* 1995; 17:779-783.
- [52] Liu H, Liu XM, Li SC, Wu BC, Ye LL, Wang QW et al. A high-yield and scaleable adenovirus vector production process based on high density perfusion culture of HEK 293 cells as suspended aggregates. *J Biosc Bioeng* 2009; 107 (5): 524-529.
- [53] Nadeau I, Garnier A, Côté J, Massie B, Chavarie C, Kamen A. Improvement of Recombinant Protein Production with the Human adenovirus/293S Expression System Using Fed-Batch Strategies. *Biotechnol Bioeng* 1996; 51:613-623.
- [54] Nadeau I, Jacob D, Perrier M, Kamen A. 293SF Metabolic Flux Analysis during Cell Growth and Infection with an Adenoviral Vector. *Biotechnol Prog* 2000; 16: 872-884.

4.3 Expériences et résultats complémentaires d'infection

4.3.1 Effet du changement de température

Les cellules HEK-293 sont cultivées à 37°C, mais ont été infectées à 35°C (en se basant sur les publications relatives à la lignée humaine PER.C6). Une étude de comparaison de croissance a donc été réalisée afin de s'assurer que le changement de température ne limitait pas la croissance.

Deux batchs de cellules HEK-293 ont donc été placées à 35 et 37°C, 5% CO₂, dans deux incubateurs différents. Les cellules étaientensemencées à 1×10^6 cell/mL dans du milieu HyQ, et laissées en culture pendant 1 semaine. La densité cellulaire et la viabilité étaient suivies quotidiennement (Fig 4.9).

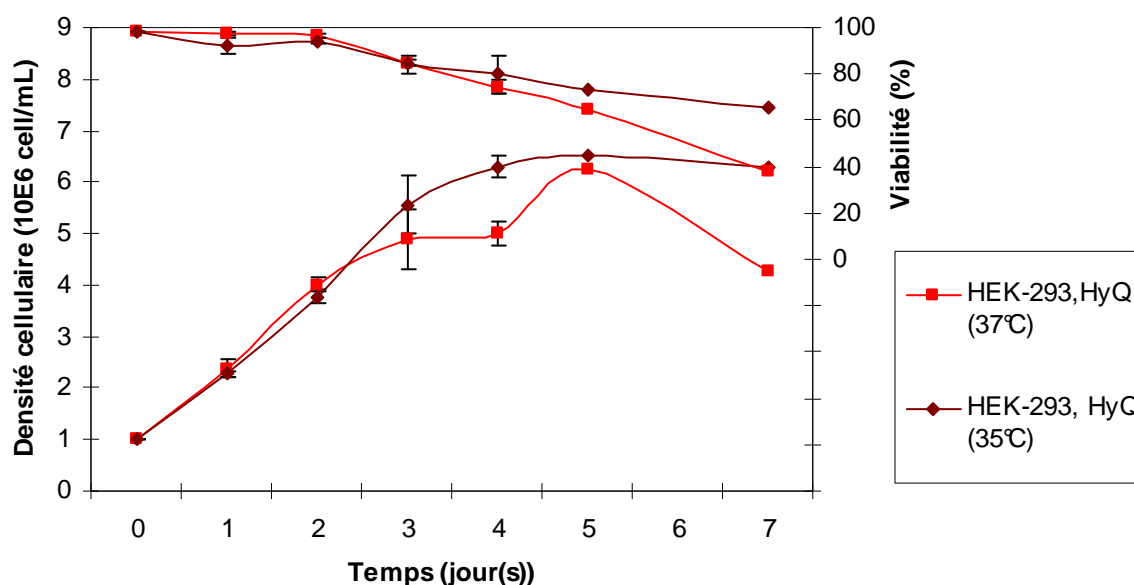


Figure 4.9: Croissance comparative des HEK-293 à 35 et 37°C.

Les résultats de cette étude réalisée en duplicata indiquent que la baisse de température ne semble pas avoir d'effet limitant ou inhibiteur sur la croissance cellulaire.

4.3.2 Effet de la trypsine (titres infectieux)

Comme énoncé précédemment (Chapitre II) et détaillé dans ce chapitre, la trypsine est l'un des paramètres critiques influençant l'efficacité de l'infection. L'expérience visant à déterminer la meilleure concentration de la trypsine a été réalisée et les résultats de croissance cellulaire et les titres HA sont présentés et commentés dans l'article. A titre d'information complémentaire, les titres infectieux de cette même étude sont présentés ci-dessous (Fig 4.10); ils ont été mesurés lorsque les titres HA avaient atteint leur maximum 4 jours après infection.

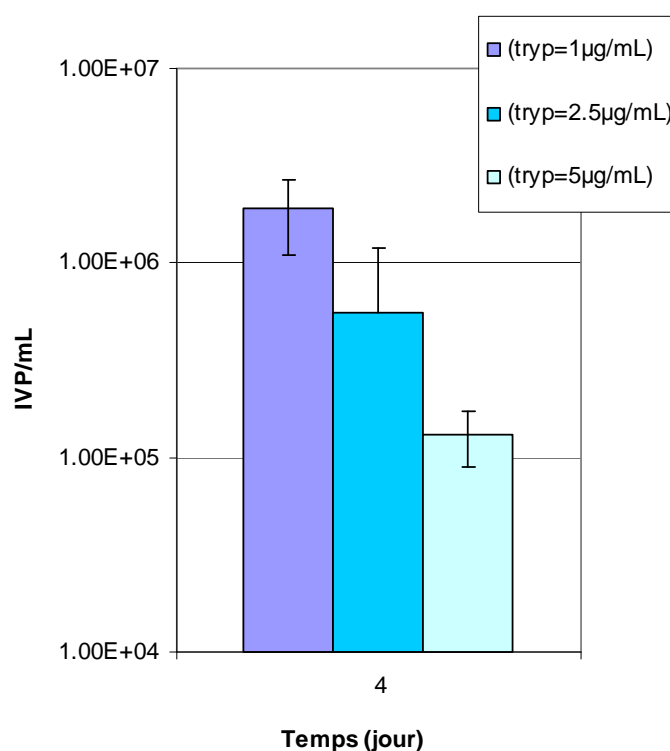


Figure 4.10: Effet de la trypsine sur les titres infectieux.

Les titres infectieux corroborent les résultats des tests HA présentés juste avant dans l'article, et indiquent que la plus faible concentration de trypsine non nulle (1µg/mL) donne les meilleurs résultats de production avec un titre infectieux de 10⁶ IVP/mL.

4.3.3 Comparaison de croissance et de production lors du changement d'échelle, avec changement de milieu à l'infection

But de l'étude : Une étude de comparaison de croissance et de production en milieu d'infection (VGM) a été réalisée à différentes échelles afin de vérifier si les titres produits à petite échelle étaient transposables à plus grande échelle. Une culture de cellules en milieu VGM non infectées a servi de contrôle. Suivant le protocole initialement appliqué à petite échelle (erlenmeyers de 20mL), un changement de milieu avant l'infection a été opéré à chaque échelle.

Protocole : Les cellules issues d'une même maintenance ont servi à inoculer un bioréacteur de 3L, et deux cultures de 20mL et 350mL. Une culture batch de 20mL de ces mêmes cellules dans du milieu VGM (milieu HyQ + 1µg/mL de trypsine) servait de contrôle. Les deux cultures de 20 et 350 mL ont été infectées à 1×10^6 cell/mL (après changement dans du milieu VGM) par A/PR/8/34 ($\text{moi} = 10^{-3}$). Le bioréacteur a étéensemencé à 0.2×10^6 cell/mL dans du milieu HyQ et les cellules ont poussé jusqu'à atteindre la densité de cellules nécessaires pour l'infection (1.10^6 cell/mL x 3000mL). Le bioréacteur a alors été récolté afin de procéder au changement de milieu : les cellules ont été centrifugées et re-suspendues à 1.10^6 cell/mL dans du milieu VGM, puis ré-inoculées dans le bioréacteur avant ajout du virus ($\text{moi} = 10^{-3}$). Toutes les infections ont été réalisées à 35°C. Les détails concernant les paramètres de cultures du bioréacteur contrôlés en ligne (agitation = 80 rpm, aération = 300 sccm, $\text{YO}_2 = 40\%$, $\text{pH} = 7.15$) sont décrits dans le matériel et méthode de l'article. Les résultats de cette étude sont présentés sur la Fig. 4.11.

Résultats : Le contrôle de cellules dans le milieu VGM non infecté met en évidence que la croissance cellulaire est supportée par le milieu d'infection jusqu'à des densités supérieures à 5×10^6 cell/mL et une viabilité égale à 90% au bout de 5 jours (Fig.4.11.A). Les 3 cultures infectées présentent les mêmes cinétiques d'infection aux différentes échelles : la croissance cellulaire est maintenue pendant 24h après infection; avant de décroître et de stopper vers 48 hpi juste avant l'amorçage de la mort des cellules. Des titres HA équivalents (2500 HA/mL) ont été obtenus 3 à 4 jours après infection, pour les 3 cultures, avec un décalage de 24 h pour la culture de 350 mL. Les titres infectieux ont quant à eux été augmentés grâce au changement d'échelle; le

passage de la culture de 20 mL au bioréacteur de 3 L a ainsi permis d'augmenter de plus d'un log le titre infectieux jusqu'à 10^{10} IVP/mL (Fig.4.11.C). Cette augmentation peut s'expliquer par un meilleur contrôle des conditions de culture et d'infection en bioréacteur (oxygénation, pH, agitation...).

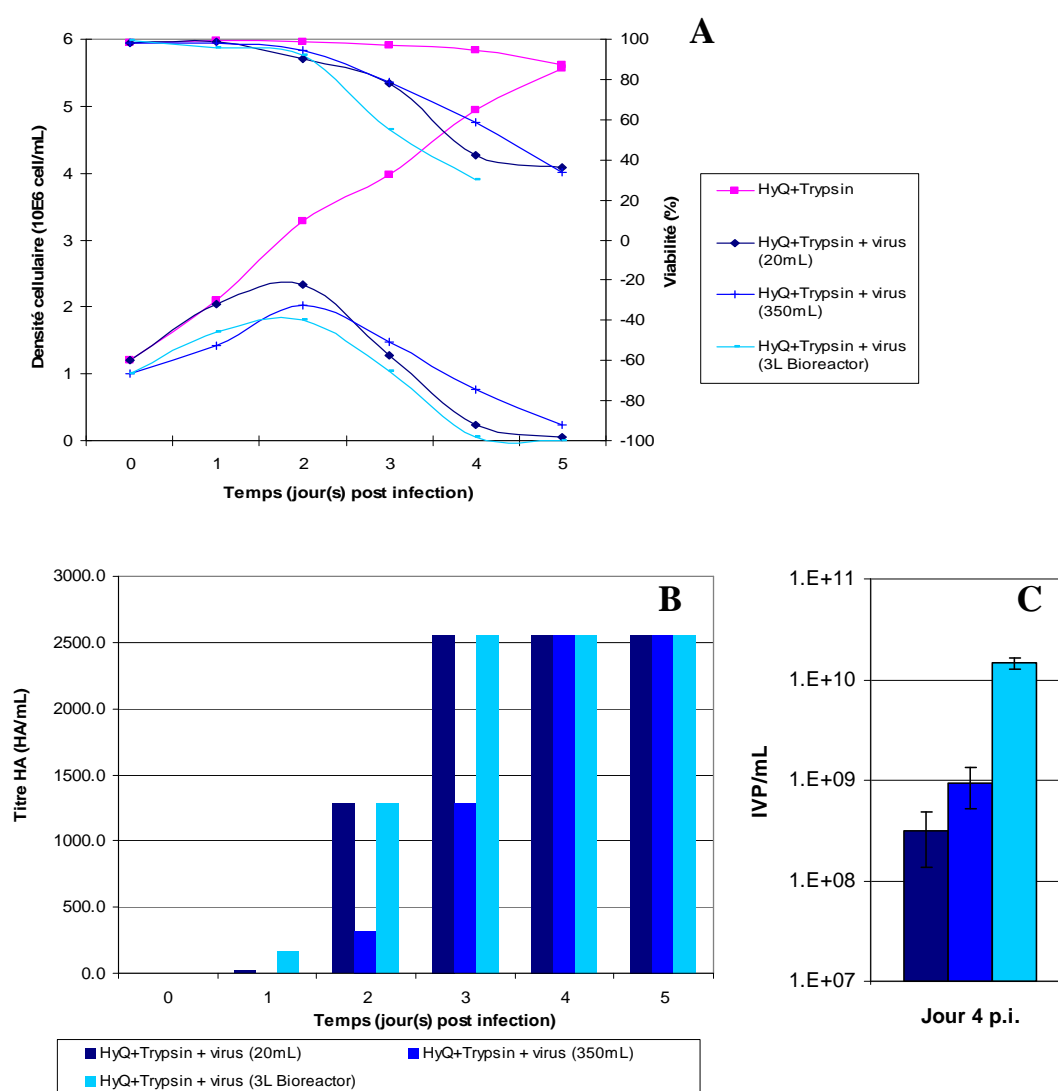


Figure 4.11: Changement d'échelle et production (avec changement de milieu avant infection). La densité cellulaire et la viabilité (A), ainsi que les titres HA (B) et infectieux (C) ont été mesurés quotidiennement pour chaque condition.

Cette étude nous a donc permis de vérifier que les titres HA et infectieux étaient maintenus ou augmentés au cours du changement d'échelle jusqu'à 10^{10} IVP/mL en bioréacteur. Cependant un

procédé incluant un changement de milieu n'est pas pratique à l'échelle industrielle (>100 L). De nouvelles expériences ont donc été conduites afin de valider un procédé s'affranchissant du changement de milieu avant l'infection (présentées dans l'article).

4.3.4 Résultats complémentaires de purification

Différentes fractions purifiées sur iodixanol et présentant des bandes HA d'intérêt par Western blot ont été envoyées à l'Institut Armand Frappier pour être analysées par microscopie électronique (NSEM) (Fig. 4.12).

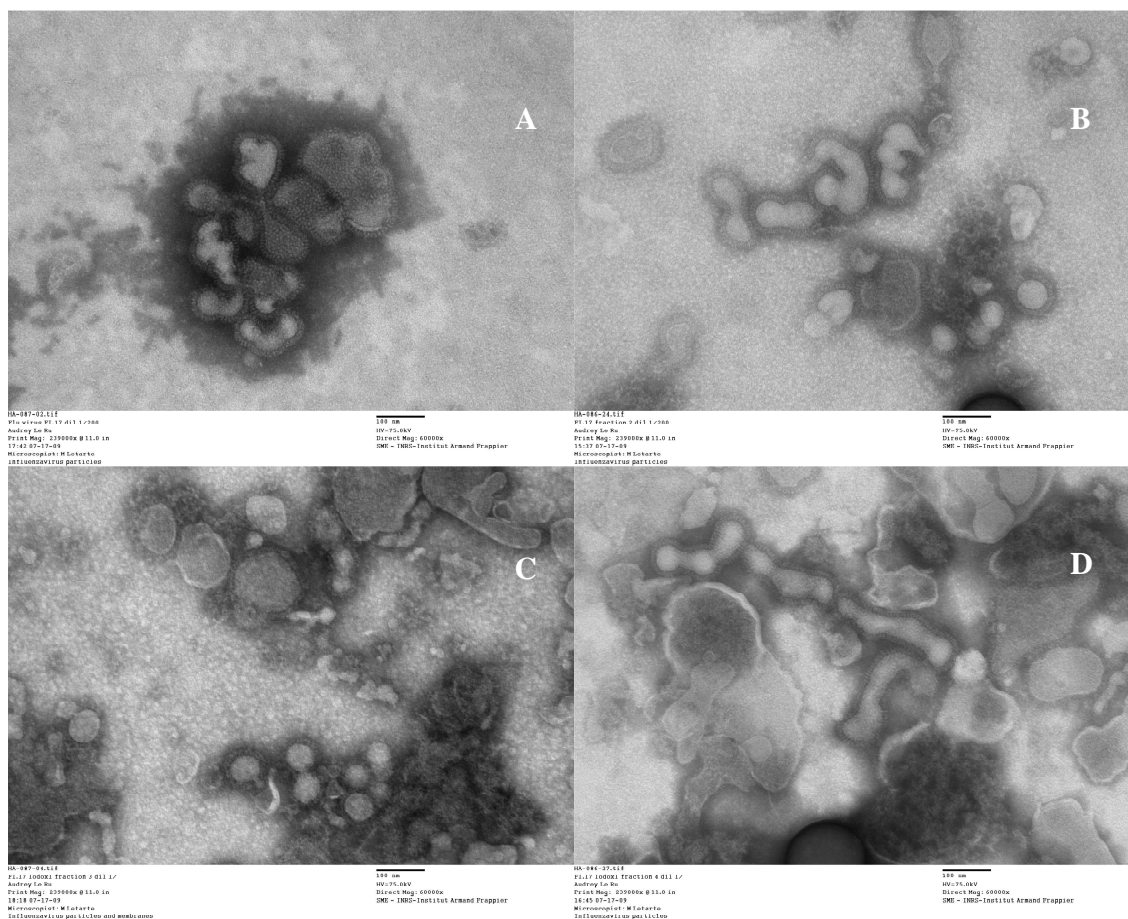


Figure 4.12: Images du virus influenza A/PR/8/34 par microscopie électronique (NSEM).

(A) : Surnageant d'infection avant purification; (B, C et D) : fractions purifiées 2 à 4 sur gradient d'iodixanol.

Ces images complètent les résultats présentés dans l'article et montrent bien la grande pléomorphie de cette souche influenza A/PR/8/34 issue d'une même production. De manière intéressante, chaque fraction d'iodixanol semble présenter un seul type morphologique avec la présence majoritaire de particules pléomorphes dans la fraction 2 (B), sphériques dans la fraction 3 (C) et allongées dans la fraction 4(D). Une méthode de séparation en fonction du gradient de densité des particules virales serait à approfondir afin de vérifier la possibilité d'isolement d'une population virale parmi un ensemble en une seule étape de purification.

DISCUSSION GÉNÉRALE

Les différentes expériences réalisées au cours de ce projet ont permis d'identifier les paramètres critiques d'infection des cellules HEK-293 par le virus influenza.

La trypsine, exogène ou endogène, est requise pour l'activation du virus influenza par le clivage de l'hémagglutinine en deux sous-unités HA actives. Comme pour les cellules PER.C6 (Pau, 2001) et Vero (Youil, 2004), l'ajout de trypsine au milieu d'infection s'est avéré nécessaire dans le cas des HEK-293 de par l'absence de l'activité protéase correspondante chez l'hôte. En effet, aucune amplification des particules virales n'a pu être observée chez les HEK-293 infectées par influenza, en absence de trypsine. La trypsine doit cependant être dosée avec précision car une trop forte concentration inhibe la croissance cellulaire et réduit la production virale qui en résulte.

La multiplicité d'infection (moi) se révèle avoir également un impact considérable sur les titres produits dans les HEK-293. Contrairement aux résultats obtenus avec les MDCK par Genzel (2006), pour lesquels la moi utilisée n'influe pas sur les titres finaux de HA ou infectieux obtenus, mais retardait juste le temps d'obtention du titre maximum, l'utilisation d'une forte moi chez les HEK-293 conduit les cellules à la mort et limite fortement la production de particules virales. La moi se révèle optimale à 10^{-3} IVP/cellule. Comme observé par Genzel (2006), les titres HA sont stables au cours des infections, tandis que les titres infectieux varient au cours du temps : ils atteignent un maximum à 48 heures post infection, puis diminuent par la suite.

Zhirnov (2009) met en avant que le virus influenza évolue constamment, d'une part pour s'adapter au mieux aux caractéristiques de la cellule hôte, d'autre part par mutation antigénique pour pouvoir échapper à une réponse immunitaire. L'adaptation des différents virus aux cellules HEK-293 a permis de mettre en évidence que trois passages successifs étaient suffisant pour permettre l'augmentation des titres viraux d'un facteur 100 (dépendamment de la souche virale utilisée), tout en limitant les risques d'accumulations adaptatives et donc d'éloignement vis-à-vis de la souche d'origine.

Comme observé par Genzel (2006) pour les cellules MDCK, le changement de milieu avant infection n'est pas une étape nécessaire avant l'infection. Les études d'infection sans changement de milieu réalisées à petite échelle avec les cellules HEK-293 n'indiquaient aucune différence de

production notoire entre un procédé incluant ou non le changement de milieu, dans les conditions préalablement établies pour des concentrations cellulaires à l'infection de l'ordre de 1×10^6 cell/mL. Le milieu HyQTransFx s'est révélé capable de supporter la croissance jusqu'à une densité cellulaire de 4×10^6 cell/mL, puis l'infection des cellules HEK-293 à cette même densité, tout en maintenant les titres produits à 10^9 IVP/mL. Cependant, les études préliminaires portant sur la mise à l'échelle du procédé avec changement de milieu avant infection résultaient en une augmentation de plus d'un log du titre infectieux lors du passage en bioréacteur, atteignant 10^{10} IVP/mL; ce qui ne fut pas observé lors de la mise à l'échelle du procédé sans changement de milieu à 4×10^6 cell/mL. Ceci suggère donc que des densités cellulaires élevées peuvent éventuellement entraîner des limitations dans un procédé sans changement de milieu lors de la mise à l'échelle du procédé.

Avant l'infection, les concentrations de glucose et de glutamine restent toutefois supérieures à 20 mM et 1.5 mM, respectivement, et sont toujours non nulles en fin d'infection. Le lactate demeure également en dessous de sa concentration inhibitrice de 20 mM avant infection. Ces valeurs doivent cependant être prises en considération car les cellules consomment plus en bioréacteur qu'en erlenmeyer ; les cellules se retrouvent ainsi proches des concentrations d'ammonium inhibitrices rapportées pour les cellules HEK-293 (1.5-2.5 mM). Il serait donc souhaitable d'infecter le bioréacteur à plus basse densité cellulaire (3×10^6 cells/mL) afin de s'éloigner de ces concentrations critiques, ou encore d'inoculer le bioréacteur à plus forte densité afin de limiter la consommation avant infection.

L'optimisation des conditions d'infection a cependant permis d'obtenir des titres infectieux de l'ordre de 10^9 à 10^{10} IVP/mL, qui se comparent avantageusement avec les plus récents résultats (10^9 IVP/mL) rapportés dans la littérature pour les cellules de références MDCK (Schulze-Horsel, 2009) et Vero (Kistner, 2007).

CONCLUSION

La méthode des œufs embryonnés, bien que complètement validée, présente de nombreux désavantages (méthode longue, fastidieuse, dépendante de l'industrie des œufs, impossibilité de reproduire certaine souche aviaire) qui contraignent fortement la capacité de production du vaccin contre la grippe. Les risques actuels de pandémies (type A/H1N1) ont rappelé aux gouvernements et aux fabricants de vaccins les limites de ce système et la nécessité d'envisager de nouvelles alternatives comme la culture de cellules. Depuis une dizaine d'années, plusieurs groupes de recherche investiguent le potentiel de trois principales lignées cellulaires, MDCK, Vero et PER.C6, qui présentent des résultats de production équivalents à ceux obtenus avec les œufs. Les recherches ont d'ailleurs abouti à des vaccins en cours d'essais cliniques ou déjà commercialisés. Les cellules de référence MDCK et Vero sont cependant cultivées en adhérence et en milieu avec sérum.

Le but de cette recherche était donc de valider la lignée HEK-293, parfaitement documentée et homologuée au niveau pharmaceutique, comme une autre plateforme pour la production de particules influenza. Ces cellules offrent l'avantage de se cultiver en suspension à hautes densités et en milieu sans sérum.

Dans ce travail, les différentes étapes nécessaires à la validation de la lignée pour la production de particules virales infectieuses ont été abordées. Les premières études ont porté sur l'identification et l'optimisation des paramètres d'infection des cellules HEK-293. Les meilleurs résultats de production ont été obtenus pour une multiplicité d'infection (moi) de 10^{-3} IVP/cell et une concentration de trypsine de $1\mu\text{g/mL}$, qui ont permis une augmentation de 2 logs du titre infectieux (10^8 IVP/mL). La concentration cellulaire à l'infection a également été étudiée et s'est avérée optimale pour 4×10^6 cells/mL. Dans ces conditions et après adaptation de la souche virale aux cellules, des titres infectieux de 10^9 IVP/mL ont pu être obtenus à petite échelle, sans changement de milieu avant l'infection. Ces résultats ont également été reproduits à l'échelle d'un bioréacteur de 3-L. Les premières étapes de purification ont permis d'isoler le virus et sa caractérisation a mis en évidence que le virus influenza produit sur HEK-293 présentait bien toutes les caractéristiques requises. Ces études ont donc montré que les cellules HEK-293 permettaient d'amplifier efficacement différentes souches virales influenza A/H1N1, A/H3N2 et

B, jusqu'à des titres équivalents à ceux produits dans les œufs. Cette lignée pourrait donc offrir une alternative de choix pour la production industrielle du vaccin.

Dans les perspectives, il serait intéressant de reproduire les résultats obtenus en bioréacteur et d'envisager de transposer le procédé à plus grande échelle. Les paramètres d'infection seraient également à tester de manière spécifique pour chacune des autres souches influenza. En effet, les conditions du procédé d'infection détaillé dans ce mémoire semblaient optimales pour les souches A/H1N1 et B (à expérimenter), mais permettaient difficilement l'amplification des souches H3N2 au delà de 2 passages. Ce point serait donc à investiguer. De même, les étapes de purification et de caractérisation pourraient encore être optimisées afin d'identifier et d'éliminer les contaminants. La mise au point d'un procédé par chromatographie liquide permettrait de s'affranchir des contaminants et serait également envisageable pour la quantification des fractions purifiées.

Par ailleurs, de nouvelles méthodes de quantification plus robustes des particules totales et infectieuses seraient à développer. Les méthodes actuelles (hémagglutination, TCID₅₀) bien que couramment utilisées et servant de référence pour la comparaison entre études sont longues, fastidieuses et imprécises. Ainsi, le test TCID₅₀ requiert une semaine d'attente avant d'avoir les résultats des titres infectieux. Le test d'hémagglutination est quant à lui relativement rapide. Cependant ce test est peu précis puisque sa sensibilité varie du simple au double (dilution 1/2), et elle est variable en fonction de la qualité du lot des globules rouges. De plus, la lecture de la plaque se faisant à l'œil nu, elle dépend de l'appréciation de l'opérateur. Il s'avère donc relativement difficile de comparer des résultats de HA issus de la littérature. De nombreuses pistes de quantification sont possibles et plusieurs ont été développées avec succès comme la RT-PCR qui permettrait d'amplifier et de quantifier les copies du génome viral. Cette méthode, adaptée à la souche d'intérêt, permettrait la quantification des particules totales ou infectieuses, dépendamment de l'échantillonnage. La cytométrie de flux (FACS) permettrait quant à elle la quantification des particules infectieuses, par marquage des cellules infectées avec des anticorps ciblant les antigènes du virus.

BIBLIOGRAPHIE

Acheson NH (2006). Fundamentals of molecular virology. *Ed. Wiley* (first edition).

Alain R, Nadon F, Séguin C, Payment P, Trudel M (1987). Rapid virus subunit visualization by direct sedimentation of samples on electron microscope grids. *J Virol Meth* 16: 209-216.

Ansorge S, Lanthier S, Transfiguracion J, Durocher Y, Henry O, Kamen A (2009). Development of a scalable process for high-yield lentiviral vector production by transient transfection of HEK293 suspension cultures. *J Gene Med* 11: 868-876. doi: 10.1002/jgm.1370.

Ashkenazi S, Vertruyen A, Arístegui J, Esposito S, McKeith DD, Klemola T (2006). Superior Relative Efficacy of Live Attenuated Influenza Vaccine Compared With Inactivated Influenza Vaccine in Young Children With Recurrent Respiratory Tract Infections. *The Pediatric Infectious Disease Journal* 25 (10): 870-879.

Aunins JG. (2000). Viral vaccine production in cell culture. In: *Encyclopedia of cell technology*. Spier RE (Ed.). Wiley & Sons, NY, USA, 1182-1217.

Barber GN (2001). Host defense, viruses and apoptosis. *Cell Death and Differentiation* 8:113-126

Bardiya N, Bae JH (2005). Influenza vaccines: recent advances in production technologies. *Appl Microbiol Biotechnol* 67: 299-305.

Belsey M, Evans D, Pavlou A, Savopoulos J (2005). Growth drivers and resistors of the influenza market: The importance of cell culture flu. *J Commercial Biotechnol* 12(2): 150-155.

Belsey M, Evans D, Pavlou A, Savopoulos J (2006 A). Growth drivers and resistors of the influenza market: The importance of cell culture flu. *J commerc Biotech* 12 (2): 58-69

Belsey MJ, De Lima B, Pavlou AK, Savopoulos JW (2006). From the analyst's couch : Influenza vaccines. *Nature Reviews* 5: 183-184.

Belshe RB (2004). Current status of live attenuated influenza virus vaccine in the US. *Virus Res* 103:177-185.

Berdichevsky M, Gentile MP, Hughes B, Meis P, Peltier J, Blumentals I, et al. (2008). Establishment of higher passage PER.C6 cells for adenovirus manufacture. *Biotechnol. Prog.* 24(1):158-165.

Beveridge WI (1991). The chronicle of influenza epidemics. *History and Philosophy of the Life Sciences* 13 (2): 223–234.

Bohineust A (Sept 2009). Le nouvel eldorado des laboratoires pharmaceutiques. *Le Figaro*. 2009.

Brankston G, Gitterman L, Hirji Z, Lemieux C, Gardam M (2007). Transmission of influenza A in human beings. *Lancet Infect Dis* 7 (4): 257–65.

Bright RA, Carter DM, Daniluk S, Toapanta FR, Ahmad A, Gavrilov V (2007). Influenza virus-like particles elicit broader immune responses than whole virion inactivated influenza virus or recombinant hemagglutinin. *Vaccine* 25 (19): 3871-3878.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC) (2009). Update: Novel influenza A (H1N1) virus infection-Mexico. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 58:585.

Chazal N, Gerlier D (June 2003). Virus Entry, Assembly, Budding, and Membrane Rafts. *Microbiol Mol Biol Rev*: 226-237.

Chu C, Lugovtsev V, Golding H, Betenbaugh M, Shiloach J (2009). Conversion of MDCK cell line to suspension culture by transfecting with human *siat7e* gene and its application for influenza virus production. PNAS.0905912106.

Côté J, Bourget L, Garnier A, Kamen A (1997). Study of Adenovirus Production in Serum-Free 293SF Suspension Culture by GFP-Expression Monitoring. *Biotechnol Prog* 13: 709-714.

Côté J, Garnier A, Massie B, Kamen A (1998). Serum-Free Production of Recombinant Proteins and Adenoviral Vectors by 293SF-3F6 Cells. *Biotechnol Bioeng* 59(5):567-75.

Cordat E (2006). Unraveling trafficking of the kidney anion exchanger 1 in polarized MDCK epithelial cells. *Biochem. Cell Biol.* 84(6): 949-959.

Cox RJ, Brokstad KA, Ogra P (2004). Influenza Virus: Immunity and Vaccination Strategies. Comparison of the Immune Response to Inactivated and Live, Attenuated Influenza Vaccines. *Scandinavian Journal of Immunology* 56: 1-15.

Cox RJ, Madhun AS, Hauge S, (2009). A phase I clinical trial of a PER.C6 cell grown influenza H7 virus vaccine. *Vaccine* 27(13):1889-1897.

Crucell Holland B.V. (2007): WO2007045674-A1.

Doroshenko A, Halperin SA. (2009). Trivalent MDCK cell culture-derived influenza vaccine Optaflu® (Novartis vaccines). *Expert Rev. Vaccines* 8(6):679-688.

Durocher Y, Perret S, Kamen A (2002). High-level and high-throughput recombinant protein production by transient transfection of suspension-growing human 293-EBNA1 cells. *Nucleic Acids Res* 30(2):E9.

Eccles R (2005). Understanding the symptoms of the common cold and influenza. *Lancet Infect Dis* 5(11): 718-25.

Ehrlich HJ, Muller M, Fritsch S, Zeitlinger M, Berezuk G, Löw-Baselli A, et al. (2009). A cell culture (Vero)-derived H5N1 whole-virus vaccine induces cross-reactive memory responses. *J Infect Dis.* 200(7): 1113-1118.

Fallaux FJ, Bout A, van der Velde I, van den Wollenberg DJM, Hehir KM, Keegan J, et al. (1998). New Helper cells and matched early region 1-deleted adenovirus vectors prevent generation of replication-component adenoviruses. *Hum Gene Ther.* 9(13):1909-1917.

Fedson DS (2003). Pandemic influenza and the global vaccine supply. *Clin. Infec. Dis.* 36: 1552-1561.

Ford T, Graham J, Rickwood D (1994). Iodixanol: A Nonionic Iso-osmotic Centrifugation Medium for the Formation of Self-Generated Gradients. *Analytical Biochemistry* 220: 360-366.

France EK, Glanz JM, Xu S, Davis RL, Black SB, Shinefield HR (2004). Safety of the Trivalent Inactivated Influenza Vaccine Among Children. *Arch Pediatr Adolesc Med.* 158:1031-1036.

Fukuda K, Harmanci H, Park K, Chamberland M, Pluut EI, Niemi TC, et al. (2009). Préparation et action en cas de grippe pandémique [archive]. *Organisation mondiale de la santé* :12-13.

Gambaryan AS, Robertson JC, Matrosovich MN (1999). Effects of egg-Adaptation on the Receptor-Binding Properties of Human Influenza A and B Viruses. *Virology* 258: 232-239.

Garnier A, Cote J, Nadeau I, Kamen A, Massi B (1994). Scale-up of the adenovirus expression system for the production of recombinant protein in human 293S cells. *Cytotechnol* 15:145-155.

Garten RJ, Davis CT, Russell CA, Shu B, Lindstrom S, Balish A and al (2009). Antigenic and Genetic Characteristics of Swine-Origin 2009 A(H1N1) Influenza Viruses Circulating in Humans. *Science* 325(5937), 197-201.

Genzel Y, Behrendt I, König S, Sann H, Reichl U (2004). Metabolism of MDCK cells during cell growth and influenza virus production in large-scale microcarrier culture. *Vaccine* 22: 2202-2208.

Genzel Y, Fischer M, Reichl U (2006). Serum-free influenza virus production avoiding washing steps and medium exchange in large-scale microcarrier culture. *Vaccine* 24: 3261-3272.

Genzel Y, Olmer RM, Schäfer B, Reichl U (2006). Wave microcarrier cultivation of MDCK cells for influenza virus production in serum containing and serum-free media. *Vaccine* 24: 6074-6087.

Genzel Y, Reichl U (2009). Continuous cell lines as a production system for influenza vaccines. *Expert Rev. Vaccines* 8(12): 1681-1692.

Gerdil C (2003). The annual production cycle for influenza vaccine. *Vaccine* 21(26), 1776-1779.

Govorkova EA, Matrosovich MN, Tuzikov AB, Bovin NV, Gerdil C, Fanget B, and al (1999). Selection of Receptor-Binding Variants of Human Influenza A and B Viruses in Baby Hamster Kidney Cells. *Virology* 262: 31-38.

Gregersen JP. (2008). A risk-assessment model to rate the occurrence and relevance of adventitious agents in the production of influenza vaccines. *Vaccine* 26 (26): 3297-3304.

Groth N, Montomoli E, Gentile C, Manini I, Bugarini R, Podda A. (2009). Safety, tolerability and immunogenicity of a mammalian cell-culture-derived influenza vaccine: a sequential Phase I et II clinical trial. *Vaccine* 27 (5): 786-791.

Guerra F (1993). The European-American exchange. *History and Philosophy of the Life Sciences* 15 (3): 313–327.

Harris A, Cardone G, Winkler DC, Heymann JB, Brecher M, White JM and al (2006). Influenza virus pleiomorphy characterized by cryoelectron tomography. *PNAS* 103(50): 19123-19127.

Hay A, Gregory V, Douglas A, Lin Y (2001). The evolution of human influenza viruses. *Philos Trans R soc Lond B Biol Sci* 356 (1416): 1861-70.

Henry O, Dormond E, Perrier M, Kamen A (2004). Insights Into Adenoviral Vector Production Kinetics in Acoustic Filter-Based Perfusion Cultures. *Biotech Bioeng* 86(7).

Hinshaw V, Olsen CW, Dybdahl-Sissoko N, Evans D (1994). Apoptosis: a Mechanism of Cell Killing by Influenza A and B Viruses. *J Virol*, 3667-3673.

Hoffmann E, Krauss S, Perez D, Webby R, Webster RG (2002). Eight-plasmid system for rapid generation of influenza virus vaccines. *Vaccine* 20: 3165-3170.

Horimoto T, Horimoto KI, Hatta M, Kawaoka Y (2004). Influenza A viruses possessing type B hemagglutinin and neuraminidase: potential as vaccine components. *Microbes Infect* 6 : 579-583.

Howard MK, Kistner O, Barrett PN. (2008). Pre-clinical development of cell culture (Vero)-derived H5N1 pandemic vaccines. *Biol Chem*. 389(5):569-577.

Johansson BE, Brett IC (2007). Changing perspective on immunization against influenza. *Vaccine* 25: 3062-3065.

Jordan I, Vos A, Beilfuss S, Neubert A, Breul S, Sandig V. (2009). An avian cell line designed for production of highly attenuated viruses. *Vaccine* 27(5):748-756.

Kalbfuss B, Knöchlein A, Kröber T, Reichl U (2008). Monitoring influenza virus content in vaccine production: Precise assays for the quantitation of hemagglutination and neuraminidase activity. *Biologicals* 36: 145-161.

Kamen AA, Bédard C, Tom R, Perret S, Jardin B (1996). On-Line Monitoring of Respiration in Recombinant-Baculovirus Infected and Uninfected Insect Cell Bioreactor Cultures. *Biotech BioEng* 50: 36-48.

Kapteyn JC, Drissi Saidi M, Dijkstra R, Kars C, Tjon JCMSK, Weverling GJ, and al (2006). Haemagglutinin quantification and identification of influenza A&B strains propagated in PER.C6 cells: A novel RP-HPLC method. *Vaccine* 24: 3137-3144.

Karber G (1931). Beitrag zur kollektiven behandlung pharmakologischer reihenversuche. *Exp Pathol Pharmacol* 162: 480-483.

Kawaoka Y (2006). Influenza Virology : Current topics. *Caister Academic Press*.

Kendal AP (1997). Cold-adapted live attenuated influenza vaccines developed in Russia: can they contribute to meeting the needs for influenza control in other countries? *Eur J Epidemiol* 13:591-609.

Kistner O, Barrett PN, Mundt W, Reiter M, Schober-Bendixen S, Dorner F (1998). Development of a mammalian cell (Vero) derived candidate influenza virus vaccine. *Vaccine* 16 (9-10): 960-968.

Kistner O, Howard MK, Spruth M, Wodal W, Brühl P, Gerencer M, et al (2007). Cell culture (Vero) derived whole virus (H5N1) vaccine based on wild-type virus strain induces cross-protective immune responses. *Vaccine* 25: 6028-6036.

Kitler ME, Gavinio P, Lavanchy D (2002). Influenza and the work of the World Health Organization. *Vaccine* 20 (2): S5-S14.

Klenk HD, Rott R, Orlich M, Blödorn J (1975). Activation of Influenza A Viruses by Trypsin Treatment. *Virology* 68, 426-439.

Kogure T, Suzuki T, Takahashi T, Miyamoto D, Hidari KIPJ, Guo CT, et al. (2006). Human trachea primary epithelial cells express both sialyl(α 2-3)Gal receptor for human parainfluenza virus type 1 and avian influenza viruses, and sialyl(α 2-6)Gal receptor for human influenza viruses. *Glycoconj J* 23: 101–106.

Konstantinov K, Chuppa S, Sajan E, Tsai Y, Yoon S, Golini F (1994). Realtime biomass concentration monitoring in animal cell cultures. *Trends Biotechnol* 12:324-333.

Koudstaal W, Hartgroves L, Havenga M, Legastelois I, Ophorst C, Sieuwerts M, et al. (2009). Suitability of PER.C6 cells to generate epidemic and pandemic influenza vaccine strains by reverse genetics. *Vaccine* 27(19):2588-2593.

Kurokawa M, Koyama AH, Yasuoka S, Adachi A (1999). Influenza virus overcomes apoptosis by rapid multiplication. *Int J Mol Med* 3 (5):527-30.

Kussow CM, Weichang Z, Gryte DM, Hu W-S (1995). Monitoring of mammalian cell growth and virus production process using on-line oxygen uptake rate measurement. *Enzym Microb Technol* 17:779-783.

Laver WG, Valentine RC (1969). Morphology of the isolated hemagglutinin and neuraminidase subunits of influenza virus. *Virology* 38 (1): 105-119.

Laver WG (2002). Perspectives in Medical Virologie. *Eds Zuckerman* vol 7:31-47.

Lazarowitz SG, Compans RW, Choppin PW (1973). Proteolytic cleavage of the hemagglutinin polypeptide of influenza virus. Function of the uncleaved polypeptide HA. *Virology* 52: 199-212.

Lee EU, Roth J, Paulson JC (1989). Alteration of terminal glycosylation sequences on N-linked oligosaccharides of Chinese hamster ovary cells by expression of beta-galactoside alpha 2,6-sialyltransferase. *J Biol Chem* 264 (23):13848-55.

Leroux-Roels I, Leroux-Roels G (2009). Current status and progress of prepandemic and pandemic influenza vaccine development. *Expert Rev. Vaccines* 8(4), 401-403.

Li IWS, Chan KH, To KWK, Wong SSY, Ho PL, Lau SKP et al (2009). Differential susceptibility of different cell lines to swine-origin influenza A H1N1, seasonal human influenza A H1N1, and avian influenza A H5N1 viruses. *J Clin Virol*. Doi: 10.1016/j.jcv.09.013.

Li SQ, Liu CG, Klimov A, Subbarao K, Perdue ML, Mo D et al (1999). Recombinant influenza A virus vaccines for the pathogenic human A Hong Kong 97 (H5N1) viruses. *J Infect Dis* 179:1132-1138.

Liu H, Liu XM, Li SC, Wu BC, Ye LL, Wang QW et al (2009). A high-yield and scaleable adenovirus vector production process based on high density perfusion culture of HEK 293 cells as suspended aggregates. *J Biosc Bioeng* 107 (5): 524-529.

Liu J, Shi X, Schwartz R, Kemble G (2009). Use of MDCK cells for production of live attenuated influenza vaccine. *Vaccine* 27: 6460-6463.

Lohr V, Rath A, Genzel Y, Jordan I, Sandig V, Reichl U (2009). New avian suspension cell lines provide production of influenza virus and MVA in serum-free media: Studies on growth, metabolism and virus propagation. *Vaccine*. doi:10.1016.

Lowen AC, Mubareka S (2007). Influenza virus transmission is dependent on relative humidity and temperature. *PLoS Pathog* 19; 3 (10):1470-6.

Ludwig S, Pleschka S, Wolf T (1999). A Fatal Relationship - Influenza Virus Interactions with the Host Cell. *Vir Immunol* 12 (3): 175-196.

Mahy BWJ, Kangro HO (1996). Virology methods manual. *London: Academic Press*: 41-3.

Maines TR, Jayaraman A, Belser JA, Wadford DA, Pappas C, Zeng H and al (2009). Transmission and pathogenesis of swine-origin 2009 A (H1N1) influenza viruses in ferrets and mice. *Science* 325:484-487.

Malik Peiris JS, Wen-wei T, Hui-ling Y (2009). A novel H1N1 virus causes the first pandemic of the 21st century. *Eur J Immunol* 39: 1–9

Matthews JT (2006). Egg-Based Production of Influenza Vaccine: 30 Years of Commercial Experience. *Bridge* 36 (3):17-24.

Mazur I, Anhlán D, Mitzner D, Wixler L, Schubert U, Ludwig S (2008). The proapoptotic influenza A virus protein PB1-F2 regulates viral polymerase activity by interaction with the PB1 protein. *Cell Microbiol* 10 (5): 1140-1152.

Mohler L, Flockerzi D, Sann H, Reichl U (2005). Mathematical model of influenza A virus production in large-scale microcarrier culture. *Biotech Bioeng* 90 (1): 46-58.

Monto AS, Ohmit SE (2009). Seasonal influenza vaccines: evolutions and future trends. *Expert Rev. Vaccines* 8 (4) : 383-389.

Nadeau I, Garnier A, Côté J, Massie B, Chavarie C, Kamen A (1996). Improvement of Recombinant Protein Production with the Human adenovirus/293S Expression System Using Fed-Batch Strategies. *Biotechnol Bioeng* 51:613-623.

Nadeau I, Jacob D, Perrier M, Kamen A (2000). 293SF Metabolic Flux Analysis during Cell Growth and Infection with an Adenoviral Vector. *Biotechnol Prog* 16: 872-884.

Nayak DP, Ka-Wai hui E, Barman S (2004). Assembly and budding of influenza virus. *Virus Research* 106: 147-165.

Nayak DP, Balogun RA, Yamada H, Hong Zhou Z, Barman S (2009). Influenza virus morphogenesis and budding. *Virus Research* 143(2): 147-161.

Neumann G, Watanabe T, Ito H, Watanabe S, Goto H, Gao P et al (1999). Generation of influenza A viruses entirely from cloned cDNAs. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:9345-9350.

Nicolson C, Major D, Wood JM, Robertson JS. (2005). Generation of influenza vaccine viruses on Vero cells by reverse genetics: an H5N1 candidate vaccine strain produced under a quality system. *Vaccine* 23(22): 2943-2952.

Nobusawa E, Sato K (2006). Comparison of the mutation rates of human influenza A and B viruses. *J Virol* 80 (7): 3675-8.

NZHerald (30 Nov 2006). Flu viruses can live for decades on ice. *The New Zealand Herald*. <http://www.nzherald.co.nz/health/news/article>.

Ogura H, Fujiwara T. (1987). Establishment and characterization of a virus-free chick cell-line. *Acta Medica Okayama* 41(3):141-143.

Palese P, Zavala F, Muster T, Nussenweig RS, Garcia-Sastre A (1997). Development of novel influenza virus vaccines and vectors. *J Infect Dis* 176: S45-S49.

Palker T, Kiseleva I, Johnston K, Su Q, Toner T, Szymkowiak C, et al. (2004). Protective efficacy of intranasal cold-adapted influenza A/New Caledonia/20/99 (H1N1) vaccines comprised of egg- or cell culture-derived reassortants. *Virus Res.* 105(2): 183-194.

Patterson KD, Pyle GF (1991). The geography and mortality of the 1918 influenza pandemic. *Bull Hist Med.* 65 (1): 4–21.

Pau MG, Ophorst C, Koldijk MH, Schouten G, Mehtali M, Uytdehaag F (2001). The human cell line PER.C6 provides a new manufacturing system for the production of influenza vaccines. *Vaccine* 19: 2716-2721.

Pfleiderer M, Löwer J, Kurth R (2002). Cold-attenuated live influenza vaccines, a risk-benefit assessment. *Vaccine* 20: 886-894.

Pham PL, Perret S, Cass B, Carpentier E, St-Laurent G, Bisson L (2005). Transient Gene Expression in HEK293 Cells: Peptone Addition Posttransfection Improves Recombinant Protein Synthesis. *Biotechnol Bioeng.* 90(3):332-44.

Plante M, Jones T, Allard F, Torossian K, Gauthier J, St-Félix N et al. (2001). Nasal immunization with subunit proteosome influenza vaccines induces serum HAI, mucosal IgA, and protection against influenza challenge. *Vaccine* 20: 218-225.

Reid AH, Taubenberger JK (2003). The origin of the 1918 pandemic influenza virus: a continuing enigma. *J Gen Virol* 84 : 2285-2292

Rimmelzwaan GF, Baars M, Claas ECJ, Osterhaus ADME (1998). Comparison of RNA hybridization, hemagglutination assay, titration of infectious virus and immunofluorescence as methods for monitoring influenza virus replication in vitro. *J Virol. Meth.* 74: 57-66.

Rimmelzwaan GF, Baars M, Van Amerongen G, Van Beek R, Osterhaus ADME (2001). A single dose of an ISCOM influenza vaccine induces long-lasting protective immunity against homologous challenge infection but fails to protect *Cynomolgus macaques* against distant drift variants of influenza A(H3N2) vaccines. *Vaccine* 20:158-163.

Rios M (2006). Process consideration of cell-based influenza vaccines. *Pharmaceutical Technology* 30 (4): 45-56.

Rourou S, van der Ark A, van der Velden T, Kallel H. (2007). A microcarrier cell culture process for propagating rabies virus in Vero cells grown in a stirred bioreactor under fully animal component free conditions. *Vaccine* 25(19): 3879-3889.

Scannon PJ (2006). Pharmaceutical Preparedness for a Pandemic. *The Bridge* 36 (3) : 10-16.

Schulze-Horsel J, Schulze M, Agalaridis G, Genzel Y, Reichl U (2009). Infection dynamics and virus-induced apoptosis in cell culture-based influenza vaccine production-Flow cytometry and mathematical modeling. *Vaccine* 27, 2712-2722.

Schwartz, and al. (2006). *MedImmune Vaccine Inc.*: WO2006071563-A2.

Schwarzer J, Rapp E, Hennig R, Genzel Y, Jordan I, Sandig V, et al (2009). Glycan analysis in cell culture-based influenza vaccine production: Influence of host cell line and virus strain on the glycosylation pattern of viral hemagglutinin. *Vaccine* 27:4325-4336.

Seo SH, Goloubeva O, Webby R, Webster RG. (2001). Characterization of a porcine lung epithelial cell line suitable for influenza virus studies. *J Virol* 75(19):9517-9525.

Shen C, Gu M, Song C, Miao L, Hu L, Liang D, et al (2008). The tumorigenicity diversification in human embryonic kidney 293 cell line culture *in vitro*. *Biologicals*: 36:263-268.

Simmons NL (1982). Cultured monolayers of MDCK cells: a novel model for system for the study of epithelial development and function. *Gen. Pharmacol.* 13(4): 287-291.

Simonsen L, Clarke M, Schonberger L, Arden N, Cox N, Fukuda K (1998). Pandemic versus epidemic influenza mortality: a pattern of changing age distribution. *J Infect Dis* 178 (1): 53–60.

Sims LD, Domenech J, Benigno C, Kahn S, Kamata A, Lubroth J and al (2005). Origin and evolution of highly pathogenic H5N1 avian influenza in Asia. *The Veterinary Record* : 157-159.

Smith KA, Colvin CJ, Weber PS, Spatz SJ, Coussens PM. (2008). High titer growth of human and avian influenza viruses in an immortalized chick embryo cell line without the need for exogenous proteases. *Vaccine* 26 (29-30):3778-3782.

Suarez D, Spackman E, Senne D, Bulaga L, Welsch A, Froberg K (2003). The effect of various disinfectants on detection of avian influenza virus by real time RT-PCR. *Avian Dis* 47 (3 Suppl): 1091–5.

Sugrue RJ (2007). Viruses and Glycosylation. Methods in Molecular Biology, Glycoviropology Protocols. *Humana press Inc*, Totowa, NJ.

Takizawa T, Matsukawa S, Higuchi Y, Nakamura S, Nakanishi Y, Fukuda R (1993). Induction of programmed cell death (apoptosis) by influenza virus infection in tissue culture cells. *J Gen Vir* 74: 2347-2355.

Taubenberger JK, Moren DM (2008). The pathology of influenza virus infections. *Annu Rev Pathol* 3 : 499-522.

Trabelsi K, Rourou S, Loukil H, Majoul S, Kallel H. (2006). Optimization of virus yield as a strategy to improve rabies vaccine production by Vero cells in bioreactor. *J Biotechnol*. 121(2): 261-271.

Transfiguracion J, Jaalouk DE, Ghani K, Galipeau J, Kamen A (2003). Size-exclusion chromatography purification of high-titer vesicular stomatitis virus G glycoprotein-pseudotyped retrovectors for cell and gene therapy applications. *Hum Gene Ther*. 14(12): 1139-53.

Vigerust DJ, Shepherd VL (2007). Virus glycosylation: role in virulence and immune interactions. *TRENDS in Microbiology* 15 (5).

Vivalis Ltd. (2006): WO2006108846-A1.

Voeten JTM, Brands R, Palache AM, van Scharrenburg GJM, Rimmelzwaan GF, Osterhaus ADME, et al (1999). Chracterization of high-growth reassortant influenza A viruses generated in MDCK cells cultured in serum-free medium. *Vaccine* 17: 1942-1950.

Wagner EK, Hewlett MJ, Bloom DC, Camerini D (2008). Basic Virology. *Blackwell publishing* (third edition).

Wang Q, Tao YJ (2010). Influenza : molecular virology. *Caister Academic Press* (7).

Wareing MD, Tannock GA (2001). Live attenuated vaccines against influenza: an historical review. *Vaccine* 19:3320-3330.

Wen Z, Ye L, Gao Y, Pan L, Dong K, Bu Z et al (2009). Immunization by influenza virus-like particles protect aged mice against lethal influenza virus challenge. *Antiviral Research* 84: 215-224.

Wolff MW and Reichl U (2008). Downstream Processing: From Egg to Cell Culture-Derived Influenza Virus Particles. *Chemical Engineering & Technology* 31(6): 846-857.

Youil R, Su Q, Toner TJ, Szymkowiak C, Kwan WS, Rubin B, and al (2004). Comparative study of influenza virus replication in Vero and MDCK cell lines. *J Virol Methods* 120:23-31.

Zhirnov OP, Vorobjeva IV, Saphonova OA, Poyarkov SV, Ovcharenko AV, Anhlán D, et al (2009). Structural and evolutionary characteristics of HA, NA, NS and M genes of clinical influenza A/H3N2 viruses passaged in human and canine cells. *J Clinical Virology* 45: 322-333.

URL Accessexcellence : <http://www.accessexcellence.org/RC/VL/GG/influenza.php>

URL A/H1N1 : http://www.cdc.gov/h1n1flu/vaccination/nasalspray_qa.htm
<http://www.lefigaro.fr/sante/2009/10/21/01004-20091021ARTFIG00069-un-vaccin-h1n1-en-spray-nasal-aux-etats-unis-.php>

URL CDC (Center for Disease Control and Prevention):
<http://www.cdc.gov/FLU/protect/keyfacts.htm>

URL CTR: http://www.ioe.ucla.edu/Ctr/research/AvPath/avian_influenza.html

URL INVS (Institut de Veille Sanitaire) :
http://www.invs.sante.fr/international/notes/strategies_vaccinales_a_h1n1_monde_311009.pdf

URL medscape : http://img.medscape.com/pi/emed/ckb/infectious_diseases/211212-1641774-1673658-1673954.jpg

URL Nasvax : <http://www.nasvax.com/Content.aspx?Page=releases&id=25>

http://www.tradingmarkets.com/news/stock-alert/nvs_nasvax-signs-flu-vaccine-deal-with-novartis-the-deal-comes-eight-months-after-nasvax-signed-with-gl-792640.html

URL Pandémie de grippe.

<http://www.pandemiedegrippe.com/grippe-porcine/foire-aux-questions/>

URL Pfizer :

<http://www.pfizer.ca/french/newsroom/press%20releases/default.asp?s=1&releaseID=295>

URL Santé et Services Sociaux du Québec.

http://www.msss.gouv.qc.ca/sujets/prob_sante/influenza/index.php?a_propos

URL Sciencelearn:

http://www.sciencelearn.org.nz/var/sciencelearn/storage/images/science_stories/microorganisms/sci_media/images/avian_influenza_virus/88520-1-eng-NZ/avian_influenza_virus_full_size_landscape.jpg

URL WHO (World Health Organization) :

<http://www.who.int/csr/resources/publications/influenza/whocdscsrncs20025rev.pdf>

URL WHO/CDS/2005.29 : Avian influenza : assessing the pandemic threat.

www.who.int/CSR/disease/influenza/WHO_CDS_2005_29/en/.

URL Xigris : <http://www.ema.europa.eu/humandocs/PDFs/EPAR/xigris/247102en6.pdf>

ANNEXE 1– ÉCHELLE DES PHASES PANDÉMIQUES

Description des phases de pandémie selon l'OMS (Fukuda, 2009) :

- PHASE 1 : Aucun cas d'infection chez l'homme d'un virus circulant chez les animaux.
- PHASE 2 : Un virus grippal animal, circulant chez des animaux domestiques ou sauvages, a provoqué des infections chez l'homme; ce virus est considéré comme une menace potentielle de pandémie.
- PHASE 3 : Un virus grippal, réassorti animal ou animal-humain, a été à l'origine de cas sporadiques ou de petits groupes de cas de maladie dans la population, mais n'a pas entraîné de transmission interhumaine suffisamment efficace pour maintenir des flambées à l'échelon communautaire.
- PHASE 4 : La transmission interhumaine d'un virus grippal, réassorti animal ou animal-humain, capable de provoquer des flambées à l'échelon communautaire a été vérifiée.
- PHASE 5 : Le virus identifié a provoqué des flambées soutenues à l'échelon communautaire dans au moins deux pays d'une même Région OMS.
- PHASE 6 : Outre les critères définis pour la phase 5, le même virus a provoqué des flambées soutenues à l'échelon communautaire dans au moins un pays d'une autre Région de l'OMS.

PÉRIODE SUIVANT LE PIC DE LA PANDÉMIE : Le nombre de cas de grippe pandémique a chuté au-dessous de celui observé lors du pic dans la plupart des pays exerçant une surveillance adéquate.

NOUVELLE VAGUE POSSIBLE : L'activité de la grippe pandémique augmente à nouveau dans la plupart des pays exerçant une surveillance adéquate.

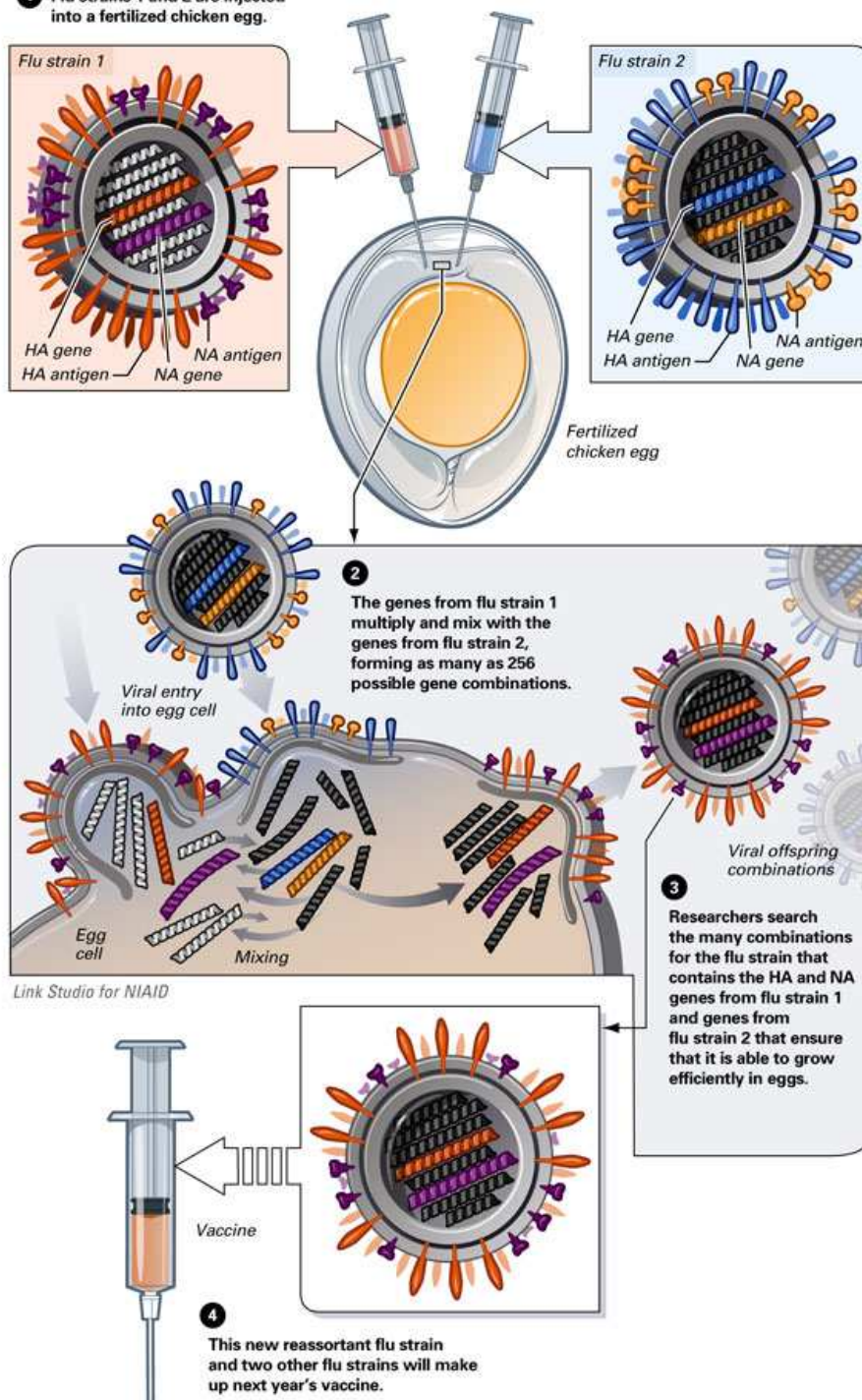
PÉRIODE POST PANDÉMIQUE : L'activité grippale a retrouvé les niveaux normalement observés pour la grippe saisonnière dans la plupart des pays exerçant une surveillance adéquate.

(Critères actualisés par l'OMS en avril 2009).

ANNEXE 2– SÉLECTION DE VIRUS RÉASSORTANTS

A flu virus contains eight gene segments. The goal is to combine the desired HA and NA genes from flu strain 1 with genes from flu strain 2, which grows well in eggs and is harmless in humans.

- 1 Flu strains 1 and 2 are injected into a fertilized chicken egg.



Courtesy: National Institute of Allergy and Infectious Diseases